

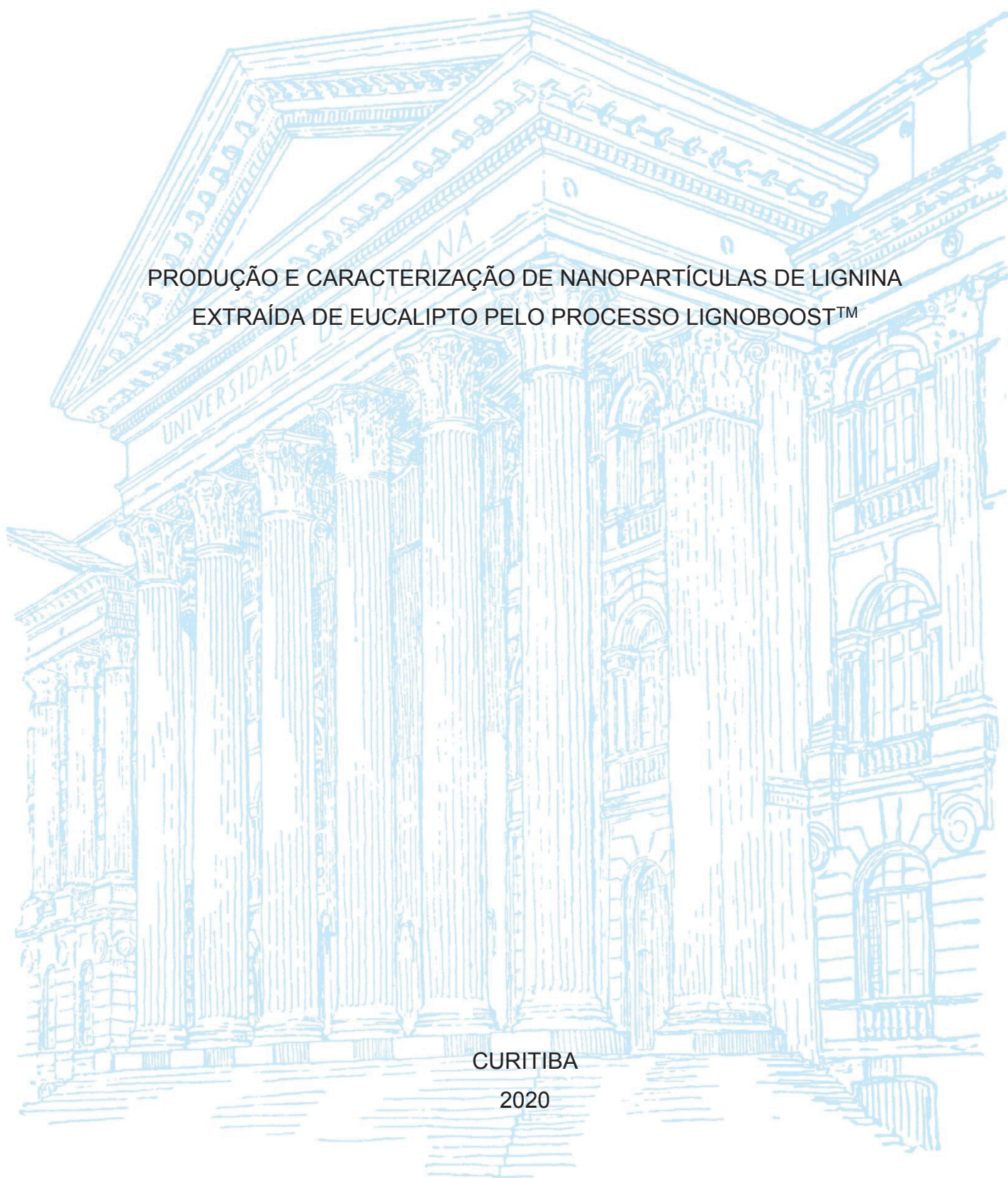
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIULIANA PAVANELI

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA
EXTRAÍDA DE EUCALIPTO PELO PROCESSO LIGNOBOOST™

CURITIBA

2020



GIULIANA PAVANELI

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA
EXTRAÍDA DE EUCALIPTO PELO PROCESSO LIGNOBOOST™

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

Coorientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

CURITIBA

2020

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

P337p

Pavaneli, Giuliana

Produção e caracterização de nanopartículas de lignina extraída de eucalipto pelo processo Lignoboost TM [recurso eletrônico] / Giuliana Pavaneli. – Curitiba, 2020.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2020.

Orientador: Luiz Pereira Ramos – Coorientador: Rilton Alves de Freitas

1. Lignina. 2. Eucalipto. 3. Precipitação (Química). 4. Nanopartículas. 5. Antioxidantes. I. Universidade Federal do Paraná. II. Ramos, Luiz Pereira. III. Freitas, Rilton Alves de. IV. Título.

CDD: 668.45

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **GIULIANA PAVANELI** intitulada: **Produção e caracterização de nanopartículas de lignina extraída de eucalipto pelo processo Lignoboost™**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovada no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Fevereiro de 2020.



LUIZ PEREIRA RAMOS

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



CAROLINE DA ROS MONTES D'OCA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



WASHINGTON LUIZ ESTEVES MAGALHÃES

Avaliador Externo (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA)

Ao João, por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos, me acolher em seu grupo e acreditar no meu trabalho, assim como agradeço por sua paciência, por compartilhar seu inestimável conhecimento em química de biomassa e seu esforço em sempre nos apresentar as melhores oportunidades e condições.

Ao Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas, por abrir as portas do Biopol – Laboratório Prof. Maria Rita Sierakowski e aceitar co-orientar esse trabalho, por compartilhar seu valioso conhecimento na área de coloides, por sua disponibilidade, paciência e valiosas contribuições para esse trabalho.

Aos professores que colaboraram com minha formação, especialmente à Prof. Dra. Sônia Faria Zawadzki que, além das análises de DSC, me motivou e me inspirou pessoalmente nessa jornada. Agradeço ao Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki do centro de RMN da UFPR, por compartilhar seu conhecimento e colaboração nas análises de RMN, assim como os colegas Dr. Leociley Rocha Alencar Menezes e Dra. Maria de Fátima Costa Santos.

À Prof. Izabel Cristina Riegel Vidotti-Miyata e à Prof. Caroline da Ros Montes D'Oca pela avaliação e contribuições no exame de qualificação.

Aos meus colegas do CEPESQ, especialmente Maria Juliane e Thiago, que tanto colaboraram na etapa de caracterização de lignina, e ao Cleverton, pelas discussões científicas na etapa de caracterização dos nanomateriais.

À EMBRAPA-Florestas (Colombo,PR) e ao Dr. Washington Magalhães pela colaboração.

Aos meus colegas do Biopol, especialmente à Joslaine, ao Cassiano e à Romelly, por me treinarem nos equipamentos, especialmente o AFM, com muita paciência. Agradeço também à Fernanda Pasqualim, por ceder parte de seu material para realização dos testes antioxidantes.

À Dra. Stelée Marcela Petris Biscaia do Laboratório de Investigação de Polímeros Sulfatados, por auxiliar nas leituras das análises antioxidantes.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR (CME) e sua equipe, sempre disposta a ajudar.

Ao colega Douglas de Mello do Laboratório de Semioquímicos por me auxiliar na reação de acetilação.

Aos meus amigos que sempre me ajudaram, cientificamente e pessoalmente: José, Alex, Ana Caroline, Morgana, Elise, Lilian, Luisinho, David, Edu, Priscila Paola, Priscila Dayane, Rafael e Luana. Vocês são especiais e tornaram meus dias mais leves. Desculpe aturá-los.

Aos meus pais Cleia e Ademar, que sempre apoiaram e incentivaram minhas ambições acadêmicas. Agradeço especialmente à minha irmã, Aline, meu exemplo

À Graciele Welter, por tudo.

Agradeço especialmente ao meu companheiro, João, pelo carinho, pelo cuidado e principalmente pela paciência nos momentos mais difíceis. Agradeço também à sua família e os divertidos almoços de domingo.

Agradeço à UFPR, ao Programa de Pós-Graduação em Química, à CAPES pela bolsa concedida e demais órgãos de fomento.

„Irrend lernt man.“

Goethe

RESUMO

A lignina é a maior fonte renovável de compostos aromáticos e o segundo biopolímero mais abundante no planeta, depois da celulose. Processos de extração da lignina a partir de materiais lignocelulósicos geram ligninas técnicas, cujas propriedades físico-químicas são modificadas em relação à lignina nativa. Atualmente, cerca de 70 Mt/ano de ligninas técnicas derivadas da polpação *kraft* são produzidas mundialmente pela indústria de papel e celulose, um coproduto que é em grande parte empregado para geração de energia por combustão a um baixo valor agregado. Tecnologias de isolamento de ligninas técnicas como o processo LignoBoost™ permitem explorar a rica estrutura química e propriedades desse material, abrindo novas possibilidades de produtos de maior valor agregado. Nesse trabalho, lignina *kraft* de eucalipto, isolada em uma planta piloto pelo processo de LignoBoost™, foi caracterizada visando a produção de nanopartículas antioxidantes de lignina por nanoprecipitação utilizando tetraidrofurano como solvente e água ultrapurificada como antissolvente. A lignina precursora das nanopartículas apresentou baixo teor de cinzas e umidade, estabilidade térmica compatível com o processo *kraft*, razão S:G (unidades Siringila e Guaiacila) igual a 4,37, 5,43 mmol g⁻¹ de hidroxilas totais, massas molares aparentes M_w e M_n de 1104 e 592 g mol⁻¹, respectivamente, com dispersidade (Đ) de 1,87. O teor de carboidratos encontrado foi elevado em relação ao relatado na literatura, de aproximadamente 10%, sendo 8% em xilanas. Uma metodologia de síntese de nanopartículas de lignina (LNPs) por nanoprecipitação a partir da lignina técnica não modificada foi definida, resultando em partículas sólidas regularmente esféricas de tamanho ajustável pela velocidade de gotejamento do solvente em antissolvente, com eventual ocorrência de partículas ocas. Os diâmetros hidrodinâmicos médios aparentes das LNPs foram de 105,6 e 75,6 nm, considerando apenas a população de menores diâmetros em uma distribuição bimodal. As análises de microscopia eletrônica comprovaram os dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e a morfologia esférica das partículas. As dispersões coloidais de nanopartículas de lignina em água apresentaram boa estabilidade em diluição, sem alterações significativas de tamanho em tempos superiores a 45 dias e pH próximo da neutralidade. As LNPs apresentaram redução de temperatura de transição vítrea (T_g) em relação ao material original, mesmo após acetilação para reduzir interação moleculares que pudessem resultar em fenômenos de aglomeração. Essa alteração na propriedade térmica pode ter sido resultante de alteração na área superficial e na distribuição de grupos funcionais expostos na superfície, alterando o efeito associativo de interações intermoleculares. O elevado teor de carboidratos na lignina precursora poderia ter reduzido o potencial antioxidante do material. No entanto, a presença de carboidratos não gerou inibição dessa atividade, como evidenciado pelo expressivo potencial antioxidante das LNPs em ensaio com o radical ABTS em solução tampão PBS pH 7,4, utilizando como referência o padrão antioxidante Trolox®. Quantidades reduzidas de LNPs foram necessárias para se atingir 50% de inibição do radical (E₅₀ = 4,04 µg mL⁻¹ e TEAC = 1,90) para um tempo de reação de 40 min. Em resumo, nanopartículas de lignina de alta estabilidade e com excelentes propriedades antioxidantes foram produzidas e caracterizadas a partir de amostras de lignina *kraft* de origem industrial.

Palavras-chave: Lignina *kraft*. Lignoboost. Nanoprecipitação. Nanopartículas. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

Lignin is the most abundant aromatic compounds source and the second most abundant biopolymer in the planet, after cellulose. Lignin extraction processes from lignocellulosic materials produce technical lignin, with modified physical-chemical properties compared to native lignin. Currently, circa 70 Mt/y of kraft pulping process technical lignin are produced globally by pulp and paper industries, a byproduct mainly used in low-value energy generation by combustion. Technical lignin isolation technologies like the LignoBoost™ process allow to explore its rich chemical structure and properties, opening new high value-added products possibilities. In this work, kraft Eucalyptus lignin isolated in a LignoBoost pilot plant was characterized, aiming at producing antioxidant lignin nanoparticles by nanoprecipitation with tetrahydrofuran as a solvent and water as a non-solvent. The lignin precursor presented low ash and moisture contents, thermal stability compatible to the kraft process, S:G ratio (Syringyl and Guaiacyl units) equal to 4.37, total hydroxyl of 5.43 mmol g⁻¹, apparent molar masses M_w e M_n of 1104 e 592 g mol⁻¹, respectively, with dispersity (\bar{D}) equal to 1.87. The carbohydrate content observed was higher related to what is often seen in the literature, approximately 10%, being 8% xylans. A lignin nanoparticle (LNP) synthesis methodology by nanoprecipitation from unmodified technical lignin was defined, resulting in regularly spherical, solid and size-tunable particles by solvent dropping rate in the non-solvent, with eventual hollow particles. The LNP's average apparent hydrodynamic diameters ranged between 105.6 and 75.6 nm, considering the smallest population in a bimodal distribution. The transmission electronic microscopy analysis was coherent with the Dynamic Light Scattering (DLS) data and the particles spherical morphology. The LNP's colloidal dispersions in water presented good stability in dilution, without significant size changes for a time range higher than 45 days and pH close to neutral. The LNPs presented glass transition temperature (T_g) reduction in comparison with the technical lignin, even after acetylation to reduce molecular interactions that could result in agglomeration phenomenon. This thermal property change may be a consequence of functional groups exposed to the surface and surface area increase, changing the intermolecular interaction associative effect. The high carbohydrate content in the technical lignin could have reduced the materials antioxidant activity. However, the carbohydrates presence did not inhibit this activity, as shown by the expressive LNPs antioxidant potential in an essay with ABTS radical in PBS pH 7.4 buffer solution, using Trolox® as the standard antioxidant. Reduced amounts of LNPs were necessary to achieve a 50% inhibition of the radical ($E_{50} = 4,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ and TEAC = 1,90) for a 40 min reaction time. In short, highly stable and excelent antioxidant LNPs have been produced and characterized from industrial kraft lignin samples.

Keywords: *Kraft* lignin. LignoBoost. Nanoprecipitaton. Nanoparticles. Antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS DOS ÁLCOOIS CINÂMICOS PRECURSORES DA LIGNINA E SUA ESTRUTURA NA LIGNINA.....	27
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA LIGNINA DE FOLHOSAS.....	27
FIGURA 3 – MECANISMO DE REAÇÃO DE DESPOLIMERIZAÇÃO DA LIGNINA PELO PROCESSO <i>KRAFT</i> : CLIVAGEM DA LIGAÇÃO β -O-4	29
FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO LIGNOBOOST™ (EXCETO AS ETAPAS DE PÓS-TRATAMENTO E SECAGEM).	30
FIGURA 5 – ESQUEMA DA CLASSIFICAÇÃO DA AUTOASSOCIAÇÃO BASEADA EM TAMANHO (INCLUINDO DO BLOCO UNITÁRIO), NATUREZA DO PROCESSO (CINÉTICO OU TERMODINÂMICO) E SISTEMA (BIOLÓGICO OU INTERFACIAL).....	32
FIGURA 6 – ESQUEMA COMPARATIVO ENERGÉTICO (ENERGIA LIVRE DE GIBBS) ENTRE AUTOASSOCIAÇÃO EM EQUILÍBRIO E NÃO-EQUILÍBRIO.	33
FIGURA 7 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO EFEITO HIDROFÓBICO PELA FORMAÇÃO DE ESTRUTURA DE “ <i>ICEBERG</i> ” AO REDOR DE MOLÉCULAS HIDROFÓBICAS.	34
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE INTERAÇÕES π - π ENTRE ANÉIS AROMÁTICOS.	35
FIGURA 9 – ESQUEMA DA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POR NANOPRECIPITAÇÃO POR TROCA DE SOLVENTE PELAS TÉCNICAS DE (A) DIÁLISE COM MEMBRANA E (B) NANOPRECIPITAÇÃO POR GOTEJAMENTO.	36
FIGURA 10 – MECANISMO DE REAÇÃO RADICALAR EM CADEIA DA AUTO-OXIDAÇÃO DE UM SUBSTRATO (RH) FORMANDO UM HIDROPERÓXIDO ALQUÍLICO (ROOH). X•, RADICAL; SOD, SUPERÓXIDO DISMUTASE; CAT, CATALASE; AH, ANTIOXIDANTE	44
FIGURA 11 – ESQUEMA DA METODOLOGIA DE NANOPRECIPITAÇÃO EM ANTISSOLVENTE POR GOTEJAMENTO PARA PRODUÇÃO DE LNPS (NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA).....	55

FIGURA 12 – QUANTIFICAÇÃO POR PADRONIZAÇÃO INTERNA DE CARBOIDRATOS NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITOIS EM LIGNINA LIGNOBOOST DE EUCALIPTO, EMPREGANDO CG-MS COM MONITORAMENTO DO ÍON CORRESPONDENTE AO FRAGMENTO m/z 115 (ANÁLISES EM TRIPLICATA).	61
FIGURA 13 – ESPECTRO NO INFRAVERMELHO (FTIR-ATR) DAS AMOSTRAS DE LIGNINA NÃO MODIFICADA E MODIFICADA (RESOLUÇÃO 2 cm^{-1} , 128 SCANS).....	62
FIGURA 14 – SOLUBILIDADE DA LIGNINA NÃO MODIFICADA E ACETILADA (100 mg EM 10 mL) EM DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS, EMPREGANDO TEMPERATURA AMBIENTE, 10 min EM BANHO DE ULTRASSOM, FILTRAÇÃO A VÁCUO EM FILTRO DE POROSIDADE MÉDIA E SECAGEM POR 4 h A $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ANOVA, $p<0,05$; TUKEY $p<0,001$).....	65
FIGURA 15 – DISTRIBUIÇÃO EM MASSAS MOLARES APARENTES DA LIGNINA LIGNOBOOST DE EUCALIPTO ANTES E APÓS A REAÇÃO DE ACETILAÇÃO, OBTIDA POR CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL NA CONCENTRAÇÃO DE 10 mg mL^{-1} EM THF.....	66
FIGURA 16 – ESPECTRO ^{31}P RMN DA LIGNINA ACETILADA E NÃO MODIFICADA EM PIRIDINA E CLOROFÓRMIO DEUTERADO (1,6:1).	67
FIGURA 17 – MAPA DE CORRELAÇÃO DE RMN 2D HSQC ^1H - ^{13}C EM DMSO DEUTERADO DA REGIÃO AROMÁTICA COM IDENTIFICAÇÃO DE ESTRUTURAS RELATIVAS AOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS.	70
FIGURA 18 – MAPA DE CORRELAÇÃO DE RMN 2D HSQC ^1H - ^{13}C EM DMSO DEUTERADO DA REGIÃO ALIFÁTICA OXIGENADA COM IDENTIFICAÇÃO DE ESTRUTURAS RELATIVAS AOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS.	71
FIGURA 19 – ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA LIGNINA NÃO MODIFICADA (FLUXO DE $40\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ DE N_2 E TAXA DE AQUECIMENTO DE $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ DE 24 ATÉ $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$)	73
FIGURA 20 – CURVA DE AQUECIMENTO DE DSC DAS LIGNINAS NÃO-MODIFICADA E ACETILADA (FLUXO DE $40\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ DE N_2 E TAXA DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO DE $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ NA FAIXA DE TEMPERATURA DE 0 A $200\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	74

FIGURA 21 – DISTRIBUIÇÃO BIMODAL DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE DE LNPs ANALISADAS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO A 90° (AMOSTRA REPRESENTATIVA)	76
FIGURA 22 – TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE LNP COM 1 E 15 DIAS EM DISPERSÃO EM SOLUÇÃO DE KCl 0,01 mol L ⁻¹ EM ÁGUA ULTRAPURA, COM ADIÇÃO DE HCl 0,01 mol L ⁻¹ ATÉ pH 3 E NaOH 0,01 mol L ⁻¹ ATÉ pH 9.....	79
FIGURA 23 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DA AMOSTRA 1.2M DE LNPS, APÓS 15 (I, II, III e IV) E 33 DIAS (V SEM SONICAÇÃO E VI SONICADA) EM DISPERSÃO.	79
FIGURA 24 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DA AMOSTRA 1.4M DE LNPS, APÓS 15 (I, II, III e IV) E 33 DIAS (V e VI) EM DISPERSÃO.....	80
FIGURA 25 – CURVA DE AQUECIMENTO DE DSC DAS LNPS 1.2M E 1.4M (FLUXO DE 40 mL min ⁻¹ DE N ₂ , TAXA DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO DE 10 °C min ⁻¹ , EM FAIXA DE TEMPERATURA DE 0 A 200 °C).....	81
FIGURA 26 – ESTRUTURAS DO TROLOX®, ABTS [2,2'-AZINO-BIS (3-ETILBENZOTIAZOLIN) 6-ÁCIDO SULFÔNICO] E RADICAL ABTS ^{•+}	82
FIGURA 27 – MECANISMO DA AÇÃO ANTIOXIDANTE E ENVOLVENDO CAPTURA DE CAPTURA DE RADICAL, QUE OCORRE HIPOTETICAMENTE NA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS.....	83
FIGURA 28 – ABSORVÂNCIA DO RADICAL ABTS ^{•+} MEDIDA EM 734 NM (SOLUÇÃO TAMPÃO PBS pH 7,4) EM FUNÇÃO DO TEMPO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TROLOX® (I) E DE LNP 1.4M (II).	83
FIGURA 29 – INIBIÇÃO DO RADICAL ABTS ^{•+} EM SOLUÇÃO TAMPÃO PBS pH 7,4 EMPREGANDO O ANTIOXIDANTE PADRÃO TROLOX® POR UM TEMPO DE 40 min.	84
FIGURA 30 – INIBIÇÃO DO RADICAL ABTS ^{•+} (SOLUÇÃO TAMPÃO PBS pH 7,4) COM NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA (LNP 1.4M) EM TEMPO DE 40 min.	85

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – MÉTODOS DE PREPARO E APLICAÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA.....	40
QUADRO 2 – PARÂMETROS INSTRUMENTAIS ICP-OES PARA CARACTERIZAÇÃO DAS CINZAS DE LIGNINA LIGNOBOOST™	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PRINCIPAIS CLASSES DE LIGNINAS TÉCNICAS: ESTRUTURA E PROPRIEDADES.....	28
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DA LIGNINA <i>KRAFT</i> LIGNOBOOST™ DE EUCALIPTO.....	59
TABELA 3 – ATRIBUIÇÃO DAS BANDAS DE FTIR-ATR DAS LIGNINAS ACETILADA E NÃO MODIFICADA.....	63
TABELA 4 – IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HIDROXILAS DA LIGNINA FOSFITILADA VIA ³¹ P RMN.	67
TABELA 5 – ATRIBUIÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (Δ) DAS CORRELAÇÕES RMN 2D ¹ H- ¹³ C HSQC DA LIGNINA NÃO MODIFICADA EM DMSO- <i>D</i> ₆ E QUANTIFICAÇÃO RELATIVA EM ABUNDÂNCIA A CADA 100 ANÉIS AROMÁTICOS.	69
TABELA 6 – DIÂMETROS HIDRODINÂMICOS APARENTES DAS NANOPARTÍCULAS PRODUZIDAS VIA DIÁLISE MEDIDOS POR DLS 90°.	75
TABELA 7 – DIÂMETROS HIDRODINÂMICOS APARENTES MÉDIOS DAS AMOSTRAS PRODUZIDAS EM TRIPLICATA COM IDADES DE 1, 15 E >45D .	77
TABELA 8 – POTENCIAL ZETA (ζ) MEDIDO PARA AS LNPS PRODUZIDAS EM TRIPLICATA.....	78
TABELA 9 – EC ₅₀ E TEAC CALCULADOS PARA PADRÃO ANTIOXIDANTE TROLOX® E LNPS	84
TABELA 10 – COMPARATIVO DE RESULTADOS DE ANÁLISE ANTIOXIDANTE ABTS DE NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA E NANOCOMPLEXOS DE LIGNINA, OURO E PRATA.	86

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS	- 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
ABTS• ⁺	- Radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
Ara	- Arabinose
BHT	- Hidroxitolueno butilado
CG-EM	- Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
δ	- Deslocamento químico
\bar{D}	- Dispersão
Dh	- Diâmetro hidrodinâmico aparente
DLS	- Espalhamento de luz laser dinâmico
DLVO	- Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DPPH	- 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DS	- <i>Dry solid</i> (base seca)
DSC	- Calorimetria exploratória diferencial
DTG	- Derivada do percentual de massa em função do tempo
EC ₅₀	- Concentração efetiva de 50%
EPR	- Ressonância Paramagnética Eletrônica
FTIR-ATR	- Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier pela técnica de reflexão total atenuada
G	- Guaiacila
Gal	- Galactose
Glc	- Glucose
GPC	- Cromatografia de permeação em gel
HCl	- Ácido clorídrico
H	- p-Hidróxifenila
HSQC	- <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy</i>
ICP-OES	- Espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente
I.U.P.A.C.	- União Internacional de Química Pura e Aplicada
KCl	- Cloreto de potássio
LNP	- Nanopartícula de lignina

M _n	- Massa molar numérica média aparente
M _w	- Massa molar ponderal média aparente
NaOH	- Hidróxido de sódio
PBS	- Tampão fosfato salino
ppm	- Partes por milhão
PTFE	- Politetrafluoroetileno
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
ROS	- <i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies reativa do oxigênio)
S	- Siringila
SAS	- Antissolvente supercrítico
SIM	- Monitoramento de íon simples
T _g	- Temperatura de transição vítrea
TGA	- Análise termogravimétrica
TEAC	- Capacidade antioxidante equivalente ao trolox
TEM	- Microscopia eletrônica de transmissão
THF	- Tetraidrofurano
USD	- Dólar norte-americano
UV	- Ultravioleta
Xyl	- Xilose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 JUSTIFICATIVA.....	24
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 REVISÃO DA LITERATURA	26
4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURA DA LIGNINA.....	26
4.2 LIGNINAS TÉCNICAS E O PROCESSO LIGNOBOOST™	27
4.3 NANOPARTÍCULAS E METODOLOGIAS DE SÍNTESE	30
4.3.1 DEFINIÇÕES: NANOPARTÍCULAS, DISPERSÕES COLOIDAIIS E MICELAS.....	30
4.3.2 AUTOASSOCIAÇÃO (SELF-ASSEMBLY)	31
4.3.3 NANOPRECIPITAÇÃO.....	35
4.4 NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA: PRODUÇÃO E APLICAÇÕES	39
4.5 NANOLIGNINA E APLICAÇÕES	42
4.6 NANOPARTÍCULAS ANTIOXIDANTES.....	43
5 MATERIAL E MÉTODOS	47
5.1 MATERIAL	47
5.2 MÉTODOS	47
5.2.1 Caracterização da lignina	47
5.2.1.1 Avaliação da umidade e do teor e composição das cinzas	47
5.2.1.2 Quantificação de lignina total e carboidratos residuais.....	48
5.2.1.3 Análise elementar.....	50
5.2.1.4 Acetilação e solubilidade da lignina.....	50
5.2.1.5 Análises térmicas (TGA/DSC)	51
5.2.1.6 Análise por FTIR-ATR	51
5.2.1.7 Caracterização química via RMN ³¹ P	52
5.2.1.8 Caracterização química por RMN 2D ¹ H- ¹³ C HSQC	52
5.2.1.9 Determinação da massa molar por cromatografia de permeação em gel (GPC)	53
5.2.2 Produção e caracterização de nanopartículas de lignina	54
5.2.2.1 Nanoprecipitação por diálise	54
5.2.2.2 Nanoprecipitação por gotejamento.....	54
5.2.3 Caracterização das nanopartículas	56
5.2.3.1 Formação, raio hidrodinâmico e estabilidade	56

5.2.3.2 <i>Análise de morfologia e tamanho de partícula por técnicas de microscopia</i>	57
5.2.3.2 <i>Avaliação do potencial antioxidante das nanopartículas de lignina</i>	57
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA LIGNINA	59
6.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA	74
6.2.1 <i>Nanoprecipitação em antissolvente: troca de solvente por diálise</i>	74
6.2.2 <i>Nanoprecipitação em antissolvente por gotejamento</i>	76
6.2.3 <i>Atividade antioxidante das nanopartículas</i>	82
7 CONCLUSÃO	87
8 PERSPECTIVAS FUTURAS	88
9 REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de tecnologias sustentáveis se tornou peça fundamental para o progresso social e econômico em todo o mundo. A utilização de materiais lignocelulósicos como fonte renovável de insumos e de energia é uma alternativa importante para esse fim devido a sua abundância e ampla disponibilidade a baixos custos (ISIKGOR; BECER, 2015; ROSALES-CALDERON; ARANTES, 2019). Atualmente, a indústria de papel e celulose é a principal processadora de materiais lignocelulósicos não-alimentícios, com o objetivo de separar a celulose de outros componentes da madeira, como lignina e parte das hemiceluloses presentes na matéria-prima (EUGENIO et al., 2019).

O termo lignina se refere à molécula polifenólica depositada na parede celular durante o desenvolvimento das plantas, cuja função envolve proteger os polissacarídeos contra a degradação microbiana e conferir rigidez à estrutura da matriz lignocelulósica (VANHOLME et al., 2010). Atualmente, o modelo proposto de estrutura molecular da lignina é linear e oligomérico (CRESTINI et al., 2011). Em sua forma e distribuição original, a lignina é denominada nativa.

Os processos de extração da lignina de materiais lignocelulósicos modificam a sua estrutura nativa gerando um material que é denominado lignina técnica. Reações de despolimerização e condensação resultam em um produto com propriedades físico-químicas diferentes da lignina nativa, embora apresente composição química semelhante (SHROTRI et al., 2017; VÁZQUEZ et al., 1997).

Os principais processos industriais de extração de lignina são as polpações do tipo *kraft*, sulfito, soda e *organosolv*, sendo a primeira a mais amplamente utilizada nas indústrias de papel e celulose (LUO; ABU-OMAR, 2017). Por essa razão, a produção mundial de lignina *kraft* atinge valores da ordem de 70 milhões de toneladas por ano (FIGUEIREDO et al., 2018; KAI et al., 2016). No entanto, apenas 5% da lignina técnica produzida é direcionado a produtos de maior valor agregado como aditivos de concreto, estabilizantes e surfactantes. A grande maior parte desse material é destinada para geração de energia por combustão no valor de 80 USD ton⁻¹ (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014a; LUO; ABU-OMAR, 2017). No entanto, apenas uma fração da lignina produzida na polpação *kraft* já seria suficiente para gerar a energia necessária e alimentar a recuperação química do processo, possibilitando a destinação do excedente para outras aplicações sem

comprometer as eficiências química e energética, motivo da grande popularidade desse processo (LI; TAKKELLAPATI, 2018).

A aplicação da lignina técnica para geração de produtos de maior valor agregado é uma alternativa estratégica especialmente para sua principal geradora, a indústria de papel e celulose. Seus derivados podem dar uma grande contribuição à viabilidade econômica de processos integrados de biorrefinaria, gerando maior diversificação de produtos e aplicações. Estima-se ainda que em 2022 o mercado global de lignina técnica isolada resulte em receita de 6,2 bilhões USD (LUO; ABU-OMAR, 2017).

Diversas rotas tecnológicas já foram propostas para a valorização da lignina, como fragmentação (ou despolimerização), funcionalização e produção de copolímeros, entre outros (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014a). Processos de isolamento da lignina técnica, como os processos LignoBoost™ e LignoForce™, têm como objetivo a obtenção de ligninas com menores teores de impurezas, o que facilita a destinação dessas para várias aplicações de grande interesse comercial (LI; TAKKELLAPATI, 2018). Ambos são baseados na precipitação da lignina pela adição de CO₂, no entanto, o processo LignoForce™ conta com uma etapa preliminar de oxidação com O₂.

Apesar de sua abundância e disponibilidade, a aplicação industrial de ligninas técnicas para fins mais nobres é limitada por sua inerente variabilidade, heterogeneidade, cor e baixa reatividade (ARGYROPOULOS; CRESTINI, 2016). Além de variações devidas à fonte botânica, os processos de polpação e deslignificação aos quais a matéria-prima lignocelulósica é submetida influenciam diretamente a sua composição, estrutura química e propriedades físico-químicas (VÁZQUEZ et al., 1997). Apesar disso, a busca por tecnologias para o pleno aproveitamento da lignina tem oferecido incentivo à pesquisa para melhorar as suas propriedades e aperfeiçoar o seu processamento, buscando novas rotas e novos produtos para valorizá-la em processos economicamente viáveis. Nesse sentido, a crescente demanda por nanomateriais biocompatíveis, biodegradáveis e de baixo custo vem de encontro à possibilidade de utilização da lignina como matéria-prima capaz de atender a esses requisitos e apresentar propriedades que podem melhorar as características físico-químicas de novos materiais. Além disso, a lignina possui estrutura passível de modificações químicas, o que amplia ainda mais o espectro de suas aplicações.

O desenvolvimento de nanomateriais a partir da lignina é uma alternativa que vem sendo explorada apenas recentemente, com relatos de produção de nanopartículas, nanotubos, nanofibras e hidrogéis para várias aplicações (FIGUEIREDO et al., 2018; NAGARAJAN et al., 2013; SIPPONEN et al., 2019; THULLURI et al., 2016; ZHAO et al., 2016). Tais produtos em escala nano contribuem por uniformizar a forma e as dimensões das partículas por meio da formação controlada de agregados macromoleculares com dispersão de tamanhos definida, controlando assim uma das variáveis que limita a aplicação industrial da lignina como matéria-prima para a produção de catalisadores, componentes elétricos, materiais de reforço e matrizes para o encapsulamento de fármacos, entre outros (FIGUEIREDO et al., 2018).

Propriedades intrínsecas da lignina, como o potencial antioxidante, dependem do teor de hidroxilas fenólicas presente no material, assim como da sua massa molar (PONOMARENKO et al., 2015). Antioxidantes tem a função de inibir ou reduzir a taxa de auto-oxidação das moléculas ou tecidos que se deseja proteger, com aplicações nas indústrias cosmética, alimentícia, médica e farmacêutica (MASSARO et al., 2016). A ação antioxidante natural da lignina pode ser potencializada no material nanoparticulado pelo aumento expressivo de sua relação área/volume para diâmetros abaixo de ≈ 250 nm (RINALDI et al., 2016). Materiais antioxidantes nanoparticulados compreendem aqueles formados por agregados de moléculas intrinsecamente antioxidantes ou moléculas antioxidantes ancoradas em agregados, com características que permitem o controle de estabilidade e a aplicação em alvos biológicos (VALGIMIGLI et al., 2018).

Estudos já foram realizados sobre o potencial antioxidante de ligninas nanoparticuladas de diferentes fontes. Shikinaka et al. (2018) produziram nanopartículas antioxidantes a partir de lignina extraída por um processo de sacarificação e cominuição simultâneas. Yearla e Padmasree (2016) produziram nanopartículas de lignina com atividade antioxidante e proteção ao ultravioleta superiores às ligninas precursoras, que foram isoladas de *Leucaena leucocephala* (espécie de folhosa ou *hardwood*) utilizando dioxano ou adquiridas comercialmente da Sigma-Aldrich (extraída pelo processo soda de uma espécie de conífera ou *softwood*). Yang et al. (2018) utilizaram lignina extraída de cana-do-reino por explosão a vapor seguida de tratamento enzimático e filtração, testando a ação antioxidante das nanopartículas produzidas em hidrogéis de poli(álcool vinílico) e

quitosana. Lu et al. (2012) extraíram lignina em escala laboratorial pelo processo *organosolv* e produziram nanopartículas utilizando antissolvente supercrítico (SAS). Tian et al. (2017) fabricaram filmes de poli (álcool vinílico) e nanolignina com propriedades antioxidantes e de proteção à radiação ultravioleta, utilizando lignina originada de álamo extraída por processos *organosolv* e tratamento com solvente eutético profundo.

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar a lignina *kraft* obtida por um processo industrial de isolamento denominado LignoBoost™ e produzir nanopartículas homogêneas com atividade antioxidante. A produção de nanopartículas a partir de um coproduto abundante na indústria é um esforço para promover a viabilidade técnica e econômica da utilização da lignina em um contexto de economia circular.

2 JUSTIFICATIVA

O potencial de aplicação da lignina nanoparticulada como antioxidante é aliado às propriedades de proteção à radiação UV, biodegradabilidade, ausência de efeitos colaterais em tecidos humanos e custo baixo relacionado à utilização de um coproduto industrial (FRANGVILLE et al., 2012; VINARDELL et al., 2008; YEARLA; PADMASREE (2016). Apesar do crescente interesse na produção e aplicação de nanolignina, a maioria dos estudos realizados até o momento utiliza ligninas purificadas ou extraídas em laboratório. Poucos trabalhos se fundamentam na síntese e aplicação desses nanomateriais a partir de ligninas de processos industriais de isolamento (FIGUEIREDO et al., 2017; LIEVONEN et al., 2016).

Diante da perspectiva de escalonamento da produção de nano e micropartículas de lignina, Abbati de Assis et al. (2018) avaliaram a viabilidade de um processo industrial de atomização desenvolvido por Ago et al. (2016), com experimentos em escala piloto e simulações técnico-econômicas.

Dessa forma, esse trabalho teve por objetivo produzir, caracterizar e avaliar as propriedades antioxidantes de nanolignina utilizando como material precursor uma lignina isolada industrialmente, contendo as impurezas inerentes ao processo e sem etapas adicionais de purificação. Assim, pretende-se contribuir para o avanço de aplicações viáveis economicamente, demonstrando a aplicabilidade da metodologia para uma das fontes mais abundantes de lignina, a indústria de papel e celulose. Sua caracterização, a compreensão dos mecanismos de formação de nanopartículas e a aplicação prática dos produtos fornecem informações importantes para a substituição gradativa de matérias-primas fósseis por fontes renováveis.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir nano/micropartículas a partir de lignina técnica extraída de eucalipto (*hardwood*) e isolada pelo processo LignoBoost™, caracterizá-las quanto a suas propriedades e estabilidade e avaliar sua propriedade antioxidante.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as propriedades químicas e físico-químicas da lignina LignoBoost™ derivada de eucalipto;
- Preparar nano/micropartículas de lignina a partir de material não-modificado;
- Caracterizar as nanopartículas sintetizadas quanto a sua morfologia, dispersão de tamanhos, composição e estabilidade;
- Avaliar as propriedades antioxidantes das nanopartículas produzidas.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURA DA LIGNINA

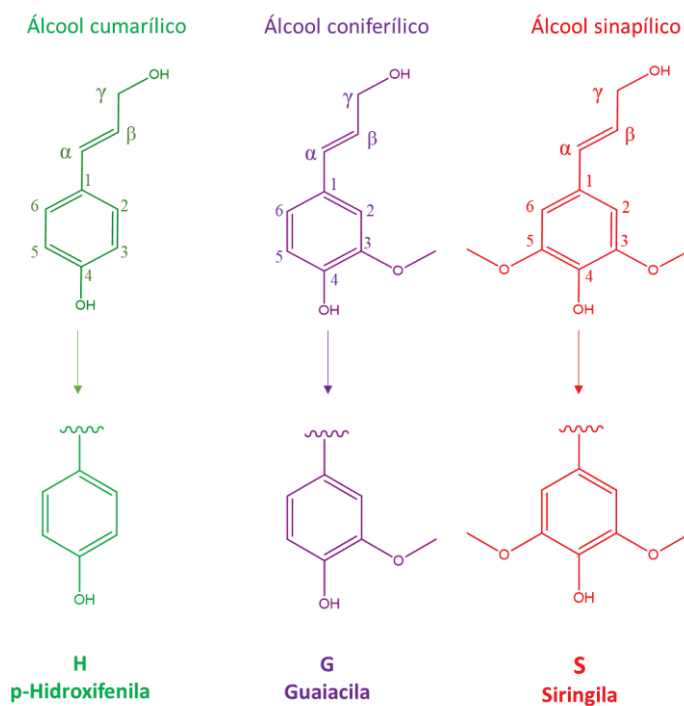
A lignina é uma matriz amorfa não-polissacarídica formada pela polimerização radicalar de três precursores monoméricos, os alcoóis *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, classificados como alcoóis cinâmicos (FIGURA 1). De estrutura complexa e parcialmente hidrofóbica, trata-se da macromolécula mais abundante na natureza depois da celulose (FENGEL; WEGENER, 1989).

O processo de biossíntese da lignina consiste na desidrogenação enzimática dos alcoóis precursores gerando radicais passíveis de deslocalização eletrônica. Esses radicais acoplam-se entre si de diferentes formas levando à formação de um polímero tridimensional que contém uma grande variedade de ligações, das quais 50% correspondem às ligações aril-éter do tipo β -O-4 (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014b).

A composição química da lignina varia entre espécies e mesmo entre diferentes tecidos de uma mesma espécie, apresentando diferentes proporções de unidades cumarila ou *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S) que são derivadas dos alcoóis *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, respectivamente. A lignina de folhosas (madeiras duras ou *hardwoods*) é composta principalmente de unidades guaiacila e siringila e traços de unidades *p*-hidroxifenila (lignina GS), enquanto a lignina de coníferas (madeiras moles ou *softwoods*) é majoritariamente composta por unidades guaiacila com baixos teores de unidades *p*-hidroxifenila (lignina G). Em gramíneas, as três unidades estão presentes em proporções que variam de espécie para espécie (ligninas HGS). Os tipos de ligação presentes entre os monômeros de lignina de folhosas são apresentados na FIGURA 2.

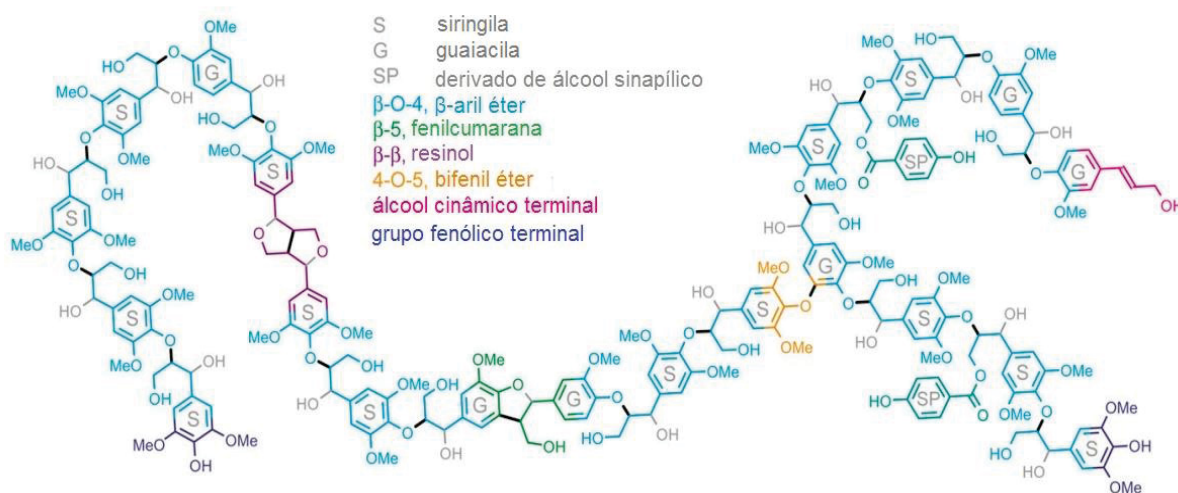
A natureza dos monômeros precursores e a combinação entre eles resulta em uma grande variedade de grupos funcionais como álcoois, éteres, ésteres e ácidos carboxílicos, oferecendo diferentes possibilidades de modificação química e, conseqüentemente, oportunidades para o desenvolvimento de tecnologias que levem a lignina a assumir um importante papel no aproveitamento integral da fitobiomassa, particularmente como fonte natural de compostos aromáticos (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014a).

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS DOS ÁLCOOIS CINÂMICOS PRECURSORES DA LIGNINA E SUA ESTRUTURA NA LIGNINA.



FONTE: A autora (2020)

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA LIGNINA DE FOLHOSAS



FONTE: Adaptado de Vanholme et al. (2010)

4.2 LIGNINAS TÉCNICAS E O PROCESSO LIGNOBOOST™

Ligninas técnicas produzidas por processos de polpação na indústria de papel e celulose sofrem modificações químicas importantes em relação à sua

estrutura nativa que são proporcionais à severidade dos tratamentos envolvidos (RINALDI et al., 2016). Apesar de cada método de extração possuir um mecanismo de despolimerização definido, o conhecimento do material de origem e do método de extração aplicado a uma amostra de lignina não é suficiente para inferir suas características estruturais e, como consequência, sua caracterização físico-química é etapa essencial para identificar os seus diferentes potenciais de aplicação. As principais classes de ligninas técnicas de origem industrial (*kraft*, lignosulfonato, soda e *organosolv*) são apresentadas na TABELA 1.

TABELA 1 – PRINCIPAIS CLASSES DE LIGNINAS TÉCNICAS: ESTRUTURA E PROPRIEDADES.

Ligninas técnicas	<i>Kraft</i>	Lignossulfonato	Soda (alcalina)	Organosolv
Estrutura				
Método de separação	Precipitação (mudança de pH)	Ultrafiltração	Precipitação (mudança de pH) e ultrafiltração	Precipitação (adição de antissolvente) e flotação
Enxofre (%)	1,0-3,0	3,5-8,0	0	0
Nitrogênio (%)	0,05	0,02	0,2-1,0	0-0,3
Massa molar (10^3 g mol⁻¹)	1,5-25	1-50	0,8-3,0	0,5-5
Dispersão (Đ)	2,5-3,5	6-8	2,5-3,5	1,5-2,5
Lignina solúvel em ácido (%)	1-5	-	1-11	~2
Solubilidade	Meio alcalino, DMF, piridina, DMSO	Água	Meio alcalino	Diversos solventes orgânicos
Tg (°C)	124-174	130	140	90-110
Td (°C)	340-370	250-260	360-370	390-400

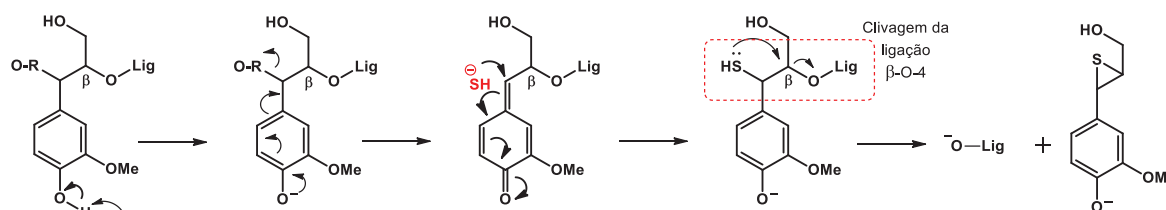
Tg: Temperatura de transição vítrea; Td: Temperatura de decomposição térmica.

Fonte: DOHERTY et al. (2011); KAI et al. (2016).

O processo de polpação *kraft* é o mais difundido industrialmente, correspondendo a 85% da produção mundial de ligninas técnicas (TEJADO et al., 2007). Nesse processo a lignina e as hemiceluloses são solubilizadas em uma solução de NaOH e Na₂S denominada licor branco que, em temperaturas de

aproximadamente 170°C, formam os íons HO^- e HS^- cuja ação química resulta na clivagem de ligações aril-éter (α e β) entre unidades fenilpropanóides por hidrólise alcalina, levando, portanto, à despolimerização da lignina. O mecanismo de reação da clivagem da ligação β -O-4, que é a mais abundante da lignina, é representada na FIGURA 3. Essa reação aumenta a presença de grupos fenólicos na estrutura e permite assim a sua remoção parcial por aumento de sua solubilidade no meio de extração (CHAKAR; RAGAUSKAS, 2004; EVSTIGNEYEV et al., 2017; PONOMARENKO et al., 2014). No entanto, há também um aumento no seu teor residual de enxofre devido à utilização de Na_2S no processo de polpação.

FIGURA 3 – MECANISMO DE REAÇÃO DE DESPOLIMERIZAÇÃO DA LIGNINA PELO PROCESSO KRAFT: CLIVAGEM DA LIGAÇÃO β -O-4



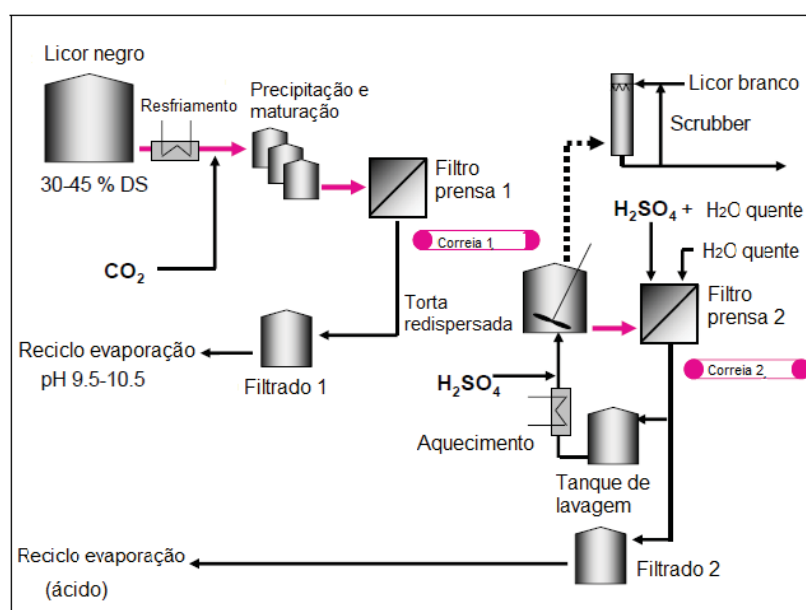
FONTE: A autora (2020)

Reações de condensação da lignina em polpa *kraft* também ocorrem devido à competição dos íons do licor branco com os nucleófilos da lignina, como carbânions em estruturas fenólicas, levando à formação de ligações C-C. Essa condensação ocorre via mecanismos de adição de Michael, onde o intermediário “quinona metídeo” é o acceptor e o íon fenolato é o nucleófilo, seguido de abstração de um próton e rearomatização. O licor negro, que é o principal coproduto da polpação *kraft*, contém a lignina despolimerizada solubilizada em meio alcalino e esse é utilizado como combustível em caldeiras dentro da própria unidade. No entanto, a quantidade de licor produzido excede a energia exigida pelo processo de produção (DUVAL; LAWOKO, 2014).

A tecnologia LignoBoost™ foi desenvolvida pela Innventia AB (Estocolmo, Suécia) para isolar uma lignina de melhor qualidade a partir do licor negro produzido pelo processo *kraft* (TOMANI, 2010). Essa tecnologia tem como vantagem produzir ligninas de alta pureza, com baixos teores de carboidratos, ácidos graxos e outros extraíveis (PONOMARENKO et al., 2014). No entanto, o grau de contaminação desses produtos depende das condições utilizadas no processo de produção. No

processo LignoBoost™ (FIGURA 4), a acidificação do licor negro pela adição de CO_2 precipita a lignina que, em seguida, é filtrada em filtro do tipo prensa. A torta retirada do filtro é então redispersa e acidificada novamente com H_2SO_4 . A lama resultante é filtrada em um segundo filtro prensa, lavada e em seguida encaminhada para comercialização do material umidificado ou para uma etapa de pós-tratamento, composta por operações de secagem e classificação granulométrica (TOMANI, 2010).

FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO LIGNOBOOST™ (EXCETO AS ETAPAS DE PÓS-TRATAMENTO E SECAGEM).



(% DS: % Dry solid - % base seca)

FONTE: Adaptado de Tomani (2010).

4.3 NANOPARTÍCULAS E METODOLOGIAS DE SÍNTESE

4.3.1 DEFINIÇÕES: NANOPARTÍCULAS, DISPERSÕES COLOIDAIIS E MICELAS

Nanopartículas são definidas pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (I.U.P.A.C.) como partículas de qualquer formato com dimensões de até 100 nm, com extensão do termo “nano” para partículas até 500 nm que apresentem propriedades que as diferenciem do material macroscópico (VERT et al., 2012). Podem ser compostas por materiais biodegradáveis ou não, com variação de

tamanhos dependente do material de origem e do método de obtenção (BARRERAS-URBINA et al., 2016).

O termo dispersão coloidal também pode ser aplicado à nanopartículas, referindo-se a partículas moleculares ou polimoleculares dispersas em um meio com pelo menos uma das dimensões entre 1 e 1000 nm, ou sistemas em que existam descontinuidades nessa ordem de grandeza (I.U.P.A.C., 2014). Ou seja, nanopartículas dispersas em um meio, atendendo essas condições, formam uma dispersão coloidal de partículas sólidas.

Micelas são agregados de dimensões coloidais formados a partir de moléculas anfifílicas das quais os surfactantes fazem parte, ou seja, contém na mesma molécula uma porção ou grupos hidrofílicos e hidrofóbicos (I.U.P.A.C., 2014). Sua formação é espontânea e geralmente formam uma vesícula esférica em água, com a porção hidrofóbica voltada ao núcleo e a porção hidrofílica voltada para a superfície externa (HUSSEINI; PITT, 2008). Micelas invertidas são formadas a partir da adição de água a uma solução de surfactante com um solvente apolar, ou então pela adição de um solvente apolar adequado a uma solução polar contendo um surfactante, formando estruturas com concentração de grupos polares no núcleo e grupos hidrofóbicos na superfície (I.U.P.A.C., 2014; QIAN et al, 2015).

4.3.2 AUTOASSOCIAÇÃO (*SELF-ASSEMBLY*)

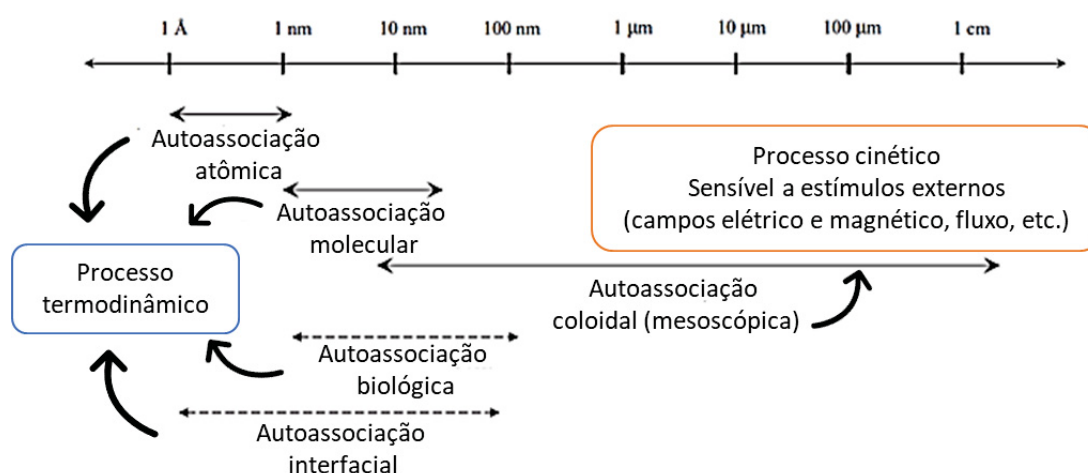
Nanopartículas podem ser formadas por técnicas *top-down* como moagem e homogeneização a alta pressão, ou técnicas *bottom-up*, com preparo baseado na autoassociação (*self-assembly*) dos seus constituintes. A autoassociação é definida como a formação espontânea de estruturas organizadas, sem intervenção externa, a partir de interações intermoleculares e coloidais (LEE, 2007; XIONG et al., 2017). Esse processo pode incluir diferentes níveis de complexidade, desde uma simples dimerização até a formação da bicamada fosfolipídica que forma a membrana celular (WANG et al., 2012).

De acordo com Lee (2007), a autoassociação pode ser classificada de três maneiras: (a) pelo tamanho e natureza das unidades capazes de se autoassociarem (blocos unitários): atômico, molecular e coloidal; (b) pelo sistema em que ocorre: biológico (aminoácidos e biopolímeros lipídicos, formando sistemas

como o DNA, RNA, membranas) ou interfacial (surfactantes, polímeros e lipídeos formando estruturas bidimensionais como micelas superficiais, monocamadas, filmes de Langmuir-Blodgett); e (c) natureza do processo: termodinâmico ou cinético.

A classificação de acordo com os itens anteriores é ilustrada em esquema na FIGURA 5. Como a autoassociação coloidal é sensível a estímulos externos, as estratégias de utilização da autoassociação nesses sistemas geralmente envolvem mudanças na solubilidade de um soluto baseando-se em gatilhos físicos ou químicos, como mudanças de temperatura, de força iônica ou o uso de antissolventes, resultando na precipitação do soluto (FREITAG, 2010).

FIGURA 5 – ESQUEMA DA CLASSIFICAÇÃO DA AUTOASSOCIAÇÃO BASEADA EM TAMANHO (INCLUINDO DO BLOCO UNITÁRIO), NATUREZA DO PROCESSO (CINÉTICO OU TERMODINÂMICO) E SISTEMA (BIOLÓGICO OU INTERFACIAL).

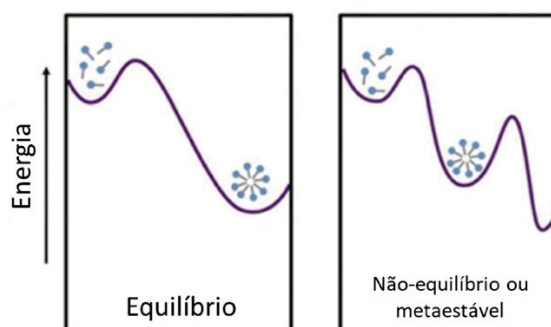


Fonte: Adaptado de Lee (2007)

A autoassociação que ocorre em equilíbrio termodinâmico também é conhecida como estática, resultando em estruturas estáveis e ordenadas, com minimização da energia livre de Gibbs, formadas em equilíbrio com os blocos unitários que as originam em solução (GRZYBOWSKI et al., 2017). Esses sistemas são encontrados geralmente em autoassociações nas escalas atômica, molecular, biológica e interfacial. O processo cinético, também conhecido como autoassociação dinâmica, ocorre em um estado de “não-equilíbrio” ou em um estado estacionário (ou metaestável), presente em sistemas de escala coloidal. No esquema comparativo entre autoassociação em equilíbrio (termodinâmica) e metaestável (cinética) ilustrado na FIGURA 6, é possível observar que o sistema

em equilíbrio atinge um mínimo global com a estrutura autoassociada, enquanto o sistema metaestável atinge um mínimo local com a formação dessa estrutura.

FIGURA 6 – ESQUEMA COMPARATIVO ENERGÉTICO (ENERGIA LIVRE DE GIBBS) ENTRE AUTOASSOCIAÇÃO EM EQUILÍBRIO E NÃO-EQUILÍBRIO.



FONTE: Adaptado de Van Rossum et al. (2017).

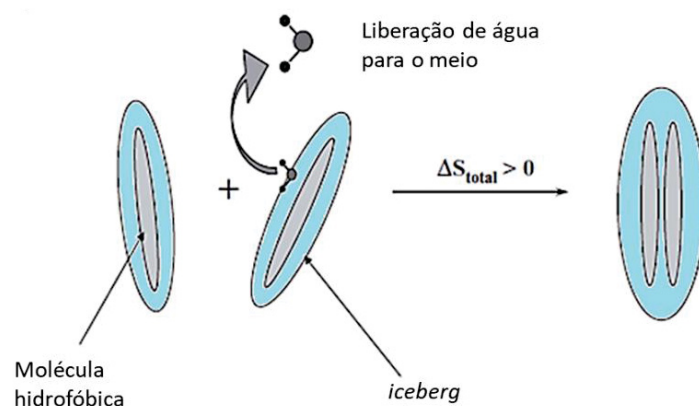
Em comum nos dois processos está o equilíbrio entre as forças intermoleculares e coloidais, entre forças atrativas (Van der Waals, hidrofobicidade, empilhamento π - π , ligação de hidrogênio, entre outras) e forças repulsivas (dupla camada elétrica, solvatação, hidratação, impedimento estérico). Enquanto as forças atrativas possibilitam a autoassociação, as forças repulsivas também são importantes para a estabilidade do coloide formado, impedindo a agregação e a floculação (COSGROVE, 2009; LEE, 2007).

Em um sistema coloidal como o de nanopartículas liofóbicas com carga superficial, sua formação e estabilidade pode ser descrita pela teoria DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek): a força atrativa de Van der Waals é a força motriz que promove a autoassociação, enquanto a dupla camada elétrica é a força repulsiva que mantém a estabilidade coloidal. Se a força atrativa superar a repulsiva devido a mudanças de pH, por exemplo, há a formação de coágulos que podem ser considerados por si só autoassociação de estruturas de escala coloidal. No entanto, da mesma forma que mudanças no sistema podem promover a agregação, essas também podem levar à dominância das forças repulsivas e reversão da coagulação (LEE, 2007).

Dentre as forças intermoleculares que atuam nos fenômenos de autoassociação, além das interações relacionadas à teoria DLVO (forças atrativas de van der Waals e repulsão da dupla camada), atuam também no sistema coloidal

aqui estudado a hidrofobicidade e o empilhamento π - π . A hidrofobicidade ou efeito hidrofóbico é especialmente importante para solutos hidrofóbicos e para o processo de troca de solvente aplicado para a formação das nanopartículas. O esquema da ação desse efeito está ilustrado na FIGURA 7 descreve a formação de uma camada denominada “iceberg”, composta por moléculas de água ao redor da molécula hidrofóbica, levando à redução da entalpia do sistema FRANK, EVANS, 1945).

FIGURA 7 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO EFEITO HIDROFÓBICO PELA FORMAÇÃO DE ESTRUTURA DE “ICEBERG” AO REDOR DE MOLÉCULAS HIDROFÓBICAS.



FONTE: Adaptado de LEE (2007)

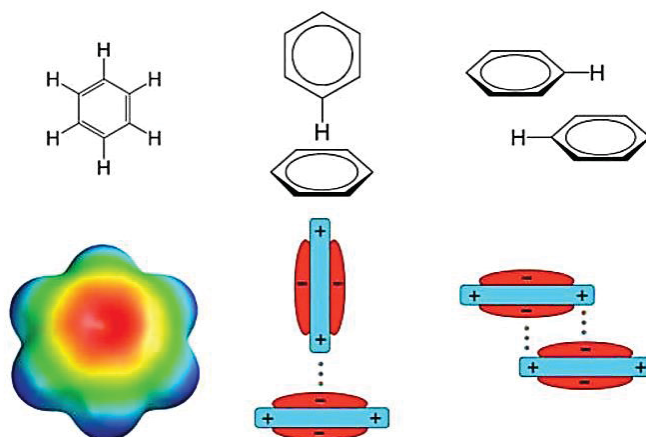
Quando duas moléculas hidrofóbicas se aproximam, a estrutura de iceberg se quebra e a liberação e consequente aumento da entropia difusional translacional das moléculas de água compensam a redução de entropia relacionada à agregação da substância hidrofóbica. Por isso, as interações entre moléculas hidrofóbicas em água são muito mais intensas do que em um meio gasoso (LEE, 2007).

Outro tipo de força intermolecular relevante para o sistema aqui abordado, especificamente por se tratar de um composto aromático, são as interações π - π ou empilhamento π - π , ilustradas na FIGURA 8. Essa força é definida como uma interação atrativa de origem eletrostática entre anéis aromáticos que leva à formação de quadripolos (dois dipolos alinhados) pela diferença de eletronegatividade dos carbonos sp^2 em relação aos hidrogênios do anel aromático (DHOTEL et al., 2013; HUNTER; SANDERS, 1990).

Os mecanismos de autoassociação e as forças intermoleculares envolvidas até o momento abordadas determinam os fenômenos que ocorrem nas diferentes metodologias de síntese de nanopartículas. A natureza do material e a metodologia

promovem mecanismos de autoassociação e cinéticas diferentes, dependentes do equilíbrio entre as forças atrativas e repulsivas da suspensão coloidal.

FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE INTERAÇÕES π - π ENTRE ANÉIS AROMÁTICOS.



FONTE: Dhotel et al. (2013)

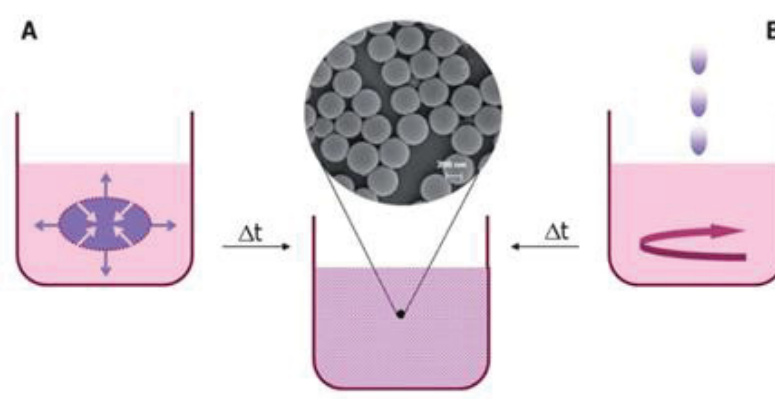
4.3.3 NANOPRECIPITAÇÃO

A nanoprecipitação também é conhecida como precipitação por troca de solvente, precipitação por antissolvente ou desolvatação. É uma técnica utilizada para produção de nano e micropartículas por autoassociação, com vantagens importantes como o baixo custo, a simplicidade do método e o curto tempo necessário para produção (BARERRAS-URBINA et al., 2016). O tamanho das partículas pode ser customizado de acordo com o sistema, sabendo que a natureza do material utilizado, sua concentração, as propriedades do solvente (difusão), a forma de adição (solvente adicionado ao antissolvente ou antissolvente adicionado ao solvente), a velocidade de adição de solvente ao antissolvente ou de antissolvente ao solvente, a velocidade e método de agitação e a temperatura afetam esse parâmetro (JOYE; McCLEMENTS, 2013; SHAKERI et al., 2014).

Dentre as diversas técnicas existentes para formação de nanopartículas, serão abordadas nesse trabalho as técnicas de nanoprecipitação por diálise e por gotejamento (FIGURA 9). Ambas utilizam como princípio a diminuição da qualidade termodinâmica do solvente, com base em uma fase orgânica na qual o polímero é solubilizado em um solvente miscível em água e uma fase aquosa na qual o

polímero é insolúvel (BHUSHAN, 2013; RIEGEL et al., 2003). Esse processo é vantajoso principalmente quando o solvente é mais volátil que o antissolvente, permitindo a obtenção de suspensões puras de nanopartículas, que podem ser utilizadas para encapsulamento de ativos que tenham interação com os polímeros utilizados (BARRERAS-URBINA et al., 2016; SALATIN et al., 2017; SCHUBERT et al., 2011).

FIGURA 9 – ESQUEMA DA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POR NANOPRECIPITAÇÃO POR TROCA DE SOLVENTE PELAS TÉCNICAS DE (A) DIÁLISE COM MEMBRANA E (B) NANOPRECIPITAÇÃO POR GOTEJAMENTO.



FONTE: Schubert et al. (2011)

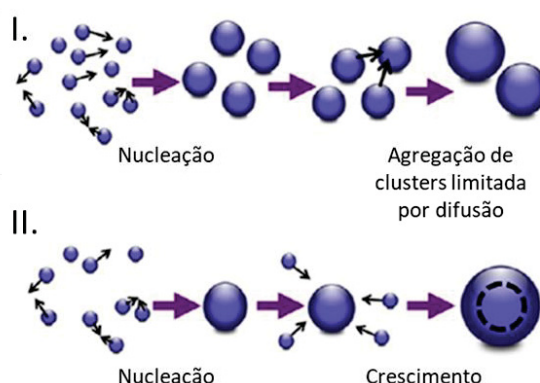
A diálise é um processo que ocorre por troca de solvente. Normalmente, faz-se uso de uma membrana de diálise contendo o polímero solubilizado em um solvente orgânico para troca com o meio aquoso externo à membrana. A troca de solvente resulta na redução da qualidade termodinâmica do solvente e a precipitação do polímero em nanoescala, disperso em água ao final do processo de diálise (BHUSHAN, 2013).

A nanoprecipitação por gotejamento é uma técnica para produção de nano e micropartículas poliméricas introduzida e patenteada por Fessi et al. (1989). O solvente orgânico é gotejado na fase aquosa geralmente presente em excesso em uma velocidade definida. A fase orgânica se difunde na fase aquosa enquanto o polímero forma nanopartículas devido à quebra da interface entre o polímero e a fase orgânica, resultando na diminuição da qualidade termodinâmica do solvente em relação ao soluto (BARRERAS-URBINA et al., 2016).

A nanoprecipitação resulta em fenômenos de autoassociação que levam à formação dos agregados nano e microparticulados. Em um processo de

nanoprecipitação em que ocorra a inversão da ordem de adição do solvente, ou seja, o antissolvente é adicionado controladamente ao solvente com soluto, a qualidade termodinâmica do solvente é reduzida gradativamente, alterando a cinética de nucleação e crescimento comparativamente ao sistema tradicional de adição do solvente ao antissolvente em excesso (JOYE; McCLEMENTS, 2013).

FIGURA 10 – ESQUEMAS REPRESENTATIVOS DOS MECANISMOS DE (I) NUCLEAÇÃO E AGREGAÇÃO DE CLUSTERS LIMITADA POR DIFUSÃO NA CONDIÇÃO DE ADIÇÃO DE SOLVENTE AO ANTISOLVENTE E (II) NUCLEAÇÃO E CRESCIMENTO NA CONDIÇÃO DE INVERSÃO DE GOTEJAMENTO.



FONTE: Adaptado de Lepeltier et al. (2014)

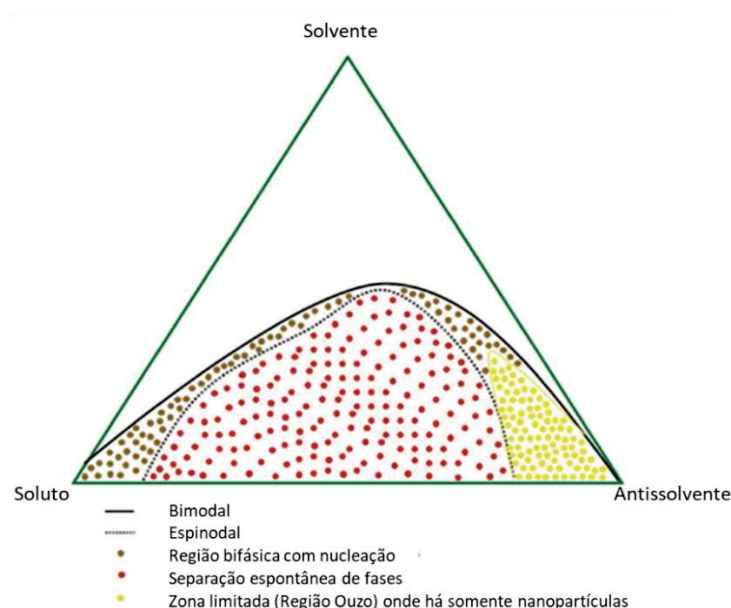
O tamanho e distribuição de tamanho das partículas depende também da condição de supersaturação do soluto: quando o solvente é gotejado no antissolvente, é criada uma condição de supersaturação alta, favorecendo a rápida nucleação em grande quantidade e a agregação limitada pela difusão, onde há a colisão aleatória entre partículas. Em condições de baixa supersaturação, presente na nanoprecipitação com inversão de gotejamento, a nucleação e o crescimento são os mecanismos dominantes. Tais mecanismos de formação também se encontram ilustrados na FIGURA 10.

Dois efeitos são geralmente utilizados para explicar o fenômeno da nanoprecipitação: o efeito Marangoni e o efeito Ouzo. Ambos possuem em sua definição parâmetros físicos que se sobrepõem como, por exemplo, gradientes de concentração, difusividade, temperatura e tensão interfacial (BECK-BROICHSITTER et al., 2010). Fessi et al. (1989) utilizaram o efeito Marangoni para explicar a formação das nanopartículas pelo efeito do antissolvente: a rápida dessolvatação do polímero após adição do solvente em um antissolvente leva à precipitação devido a turbulências na interface, resultado de fenômenos de fluxo,

difusão e variação de tensão superficial, sendo este o parâmetro mais importante para a ocorrência do efeito observado (SALATIN et al., 2017). Essa turbulência resultaria na difusão da fase orgânica na fase aquosa e formação de gotas cada vez menores, formando partículas devido à agregação das cadeias do polímero presentes nas gotas (LEPELTIER et al., 2014). No entanto, existem estudos que demonstram a formação espontânea de emulsões ou partículas independentemente da tensão interfacial e turbulência (AUBRY et al., 2009; GANACHAUD; KATZ, 2005)

O efeito Ouzo passou a ser considerado como a força motriz para formação de nanopartículas em sistemas de troca de solvente: a supersaturação rápida e local das moléculas de um soluto hidrofóbico levam à nucleação espontânea e à formação de partículas que crescem ao longo do tempo devido ao envelhecimento de Ostwald (BECK-BROICHSITTER et al., 2010; LEPELTIER et al., 2014). No diagrama ternário apresentado na FIGURA 11, a região metaestável (ou região “Ouzo”, entre os limites espinodal e binodal) é onde somente nanopartículas são obtidas (BARRERAS-URBINA et al., 2016; GANACHAUD; KATZ, 2005; LEPELTIER et al., 2014).

FIGURA 11– DIAGRAMA TERNÁRIO DE FASES GENÉRICO DE UM SISTEMA SOLUTO HIDROFÓBICO-SOLVENTE-ANTISSLVENTE COM A REGIÃO METAESTÁVEL OU REGIÃO “OUZO”



FONTE: Adaptado de BARRERAS-URBINA et al. (2016)

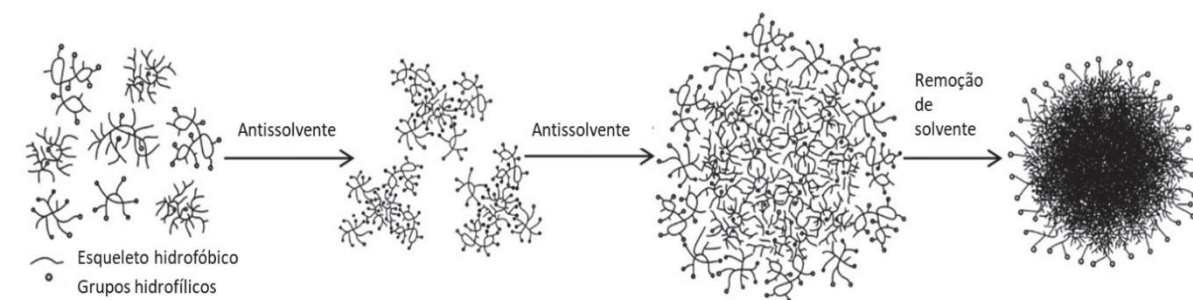
4.4 NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA: PRODUÇÃO E APLICAÇÕES

A lignina possui característica anfifílica: as porções fenilpropanóides (G, S e H) são hidrofóbicas e as hidroxilas alifáticas e fenólicas são hidrofílicas (TIAN et al., 2017). Devido a essa característica, a lignina pode ser aplicada para a formação de materiais coloidais com superfície hidrofílica pelo método de autoassociação por troca de solvente, de forma semelhante à formação de micelas (apesar de essas serem formadas por moléculas anfifílicas pequenas em relação à lignina).

Conforme ilustrado no esquema da FIGURA , as porções hidrofóbicas se atraem e se auto-organizam formando o centro do agregado, com as porções hidrofílicas se orientando em direção à sua parte externa de forma análoga a uma micela de surfactantes, conferindo-lhe assim maior estabilidade em água por longos intervalos de tempo (LIEVONEN et al., 2016).

A estabilidade coloidal, para partículas liofóbicas como as de lignina, é afetada pelas interações atrativas como as forças de van der Waals, que podem promover floculação (reversível) ou agregação (irreversível), a menos que as forças repulsivas entre as partículas em dispersão, relacionadas ao potencial Zeta, superem a composição das forças atrativas (COSGROVE, 2009).

FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AUTOASSOCIAÇÃO COLOIDAL DA MOLÉCULA ANFIFÍLICA DE LIGNINA.



FONTE: Adaptado de Qian et al. (2014).

A formação de nanopartículas, nanocápsulas, nanotubos, nanofibras, micelas ou mesmo hidrogéis de lignina permite o desenvolvimento de aplicações para diversos fins, com processos de produção aplicáveis independentemente da origem (fonte botânica e/ou tratamento deslignificante) da matriz (FIGUEIREDO et al., 2018). A uniformidade na distribuição de tamanhos e o controle da relação

área/volume proporcionadas pela formação de material nanoparticulado, aliadas às suas propriedades antioxidantes e às possibilidades de modificação química, são algumas das vantagens associadas à produção desse tipo de nanopartículas (FIGUEIREDO et al., 2018).

Diversos métodos já foram aplicados na produção de lignina nanoparticulada para os mais variados fins, empregando diferentes técnicas e resultando em diferentes morfologias. O QUADRO 1 apresenta alguns métodos de preparo *bottom up*, os tipos de lignina de origem e as aplicações identificadas como de maior potencial.

QUADRO 1 – MÉTODOS DE PREPARO E APLICAÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA.

Morfologia	Tipo de lignina	Método de preparo	Aplicações em potencial
Nanopartículas esféricas	Organosolv	Precipitação em antissolvente (solvente: acetona, antissolvente: CO ₂)	Indústria alimentícia e farmacêutica
Nanopartículas esféricas	Alcalina (Soda)	Precipitação em antissolvente (solvente: acetona/água 9:1; antissolvente: água Milli-Q)	Indústria alimentícia, farmacêutica e cosméticos
Micelas	Alcalina (soda)	Precipitação em antissolvente (solvente: dioxano; antissolvente: ciclohexano)	Blends de lignina e polietileno de alta densidade
Nanopartículas não-esféricas	<i>Kraft</i>	Precipitação em antissolvente (solvente: etilenoglicol; antissolvente: HCl)	Nanocompósitos híbridos, materiais antibacterianos, farmacêuticos, adsorventes de metais pesados
Esferas coloidais	Alcalina (soda) acetilada	Precipitação em antissolvente (THF e água)	Farmacêuticos, encapsulamento de pesticidas de liberação controlada
Nanocápsulas (esferas ocas)	<i>Kraft</i>	Precipitação em antissolvente (solvente: dioxano; antissolvente: ciclohexano)	Diversas
Nanopartículas esféricas	<i>Kraft</i>	Troca de solvente (dissolução em THF e troca por água utilizando membrana de diálise)	Nanocompósitos, emulsões de Pickering, materiais antimicrobianos, farmacêuticos para tratamento de câncer.

Fonte: FIGUEIREDO et al. (2018)

Dentre os métodos de produção de nanopartículas de lignina, a nanoprecipitação em antissolvente é uma alternativa de interesse a partir de uma técnica de simples execução em escala industrial, gerada por fenômenos de autoassociação (BEISL et al., 2018).

O método proposto por Xiong et al. (2017) para lignina oriunda de pré-tratamento por hidrólise enzimática é baseado em autoassociação e o mecanismo proposto é baseado na formação *layer-by-layer* por meio de interações π - π entre os anéis aromáticos da lignina, resultando em nanopartículas esféricas e regulares com diâmetros entre 190 e 590 nm que não apresentam alterações significativas de tamanho após 30 dias de armazenamento. Nesse trabalho a lignina não modificada quimicamente foi dissolvida em THF e o antissolvente (água deionizada) foi adicionado à solução de modo a estabelecer as relações entre o diâmetro das nanopartículas e as velocidades de gotejamento de antissolvente e de agitação. Quanto maiores essas velocidades, menores os diâmetros médios obtidos.

Utilizando o mesmo protocolo experimental e os mesmos solventes de Xiong et al. (2017), Qian et al. (2014) obtiveram nanoesferas sólidas a partir de lignina alcalina acetilada para aumentar sua hidrofobicidade, com diâmetro médio de 80 nm. Li et al. (2016) prepararam nanocápsulas esféricas irregulares a partir de lignina *kraft* não modificada quimicamente utilizando a mesma metodologia, porém, usando uma solução de água e etanol como solvente e aplicando somente a fração da lignina solúvel em etanol. Os tamanhos das cápsulas variaram com velocidade de gotejamento do antissolvente no solvente, com diâmetro médio hidrodinâmico de aproximadamente 80 nm para velocidades de gotejamento de 0,4 mL min⁻¹. No interior das cápsulas, devido a característica hidrofóbica de seu núcleo, observou-se a presença de etanol.

Recentemente, Sipponen et al. (2018) propuseram um novo mecanismo de formação de nanopartículas de lignina por nanoprecipitação em água, utilizando como solvente uma solução de etanol e água, com gotejamento da água na solução de solvente orgânico, em que a hipótese de nucleação e crescimento foi preponderante. Sipponen e seus colaboradores sugeriram, no entanto, que a nucleação se inicia pela precipitação dos maiores fragmentos de lignina como precursores dos núcleos. A fase de crescimento ocorre devido à agregação de partículas via colisão, resultando em partículas intermediárias maiores. Por fim, o processo finalizaria com a orientação da porção hidrofílica para a superfície das partículas e adsorção de fragmentos pequenos polares de lignina na superfície.

Embora maioria dos trabalhos aqui apresentados apliquem a metodologia de nanoprecipitação em que o antissolvente é adicionado ao solvente, geralmente conhecida como inversão de gotejamento, levando a uma redução gradual da

qualidade termodinâmica do solvente, a adição do solvente à água é comumente utilizada para nanoprecipitação de outros polímeros na literatura (BARRERAS-URBINA et al, 2016; FESSI et al., 1989; SCHUBERT et al., 2011). Farooq et al. (2019) produziram nanopartículas nessa configuração experimental, utilizando uma solução de acetona e água (3:1; v:v) como solvente para a lignina *kraft* de coníferas e água deionizada como antissolvente, recuperando o solvente por evaporação a vácuo. Como resultado, as nanopartículas sólidas obtidas apresentaram morfologia esférica e diâmetro médio de 102 nm.

4.5 NANOLIGNINA E APLICAÇÕES

Um compósito é um material multicomponente que consiste em múltiplos e diferentes domínios de fase, com exceção à fase gasosa, com no mínimo uma fase contínua (I.U.P.A.C., 2014). Nanocompósitos e agentes para reforço de matrizes poliméricas podem ser produzidos a partir da lignina, resultando em compósitos com melhor biocompatibilidade e melhores propriedades térmicas e mecânicas que os polímeros originais. Por exemplo, Qian et al. (2015) formaram micelas invertidas a partir de lignina, com elevada hidrofobicidade e solúveis em plásticos hidrofóbicos, com a capacidade de melhorar as propriedades mecânicas dos materiais aos quais foram adicionadas.

A lignina também pode ser utilizada para a formação de nanocápsulas para transporte de princípios ativos e estabilizantes em formulações cosméticas e farmacêuticas. Frangville et al. (2012) produziram nanocápsulas de lignina biodegradáveis e de baixa toxicidade por precipitação e encapsularam com sucesso o corante Rodamina 6G. A capacidade de associação supramolecular da lignina é interessante não somente para encapsulamento, mas também para incorporação e adsorção *layer-by-layer* de compostos ativos, possibilitando liberação controlada, redução de toxicidade e efeitos colaterais no caso de fármacos e substituição de polímeros sintéticos para essas aplicações (SHEN et al., 2011; SIPPONEN et al., 2019).

As propriedades antioxidantes das ligninas técnicas foram testadas e comparadas a antioxidantes comerciais como o BTH (hidroxitolueno butilado) (AZADFAR et al., 2015). A propriedade antioxidante é promovida por maiores quantidades de hidroxilas fenólicas e metoxilas nos anéis aromáticos, menores

quantidades de hidroxilas alifáticas, menor massa molar e baixa dispersão. Dentre esses fatores, as hidroxilas fenólicas, presentes em maior quantidade nas ligninas técnicas devido à clivagem das ligações aril-éter, são as que mais contribuem para o aumento de tais propriedades antioxidantes (KAI et al., 2016; PONOMARENKO et al., 2014).

As ligninas técnicas produzidas pelo processo LignoBoost™ normalmente possuem baixo teor de carboidratos, minimizando possíveis ligações aril-éter entre carboidratos e fenilpropanóides presentes na lignina que resultam na redução de hidroxilas fenólicas e, conseqüentemente, na redução de sua propriedade antioxidante (LAWOKO et al., 2005; PONOMARENKO et al., 2014).

Outro ponto a ser considerado é que, embora a lignina possua poder antioxidante, a lignina nanoparticulada apresenta resultados ainda melhores (LU et al., 2012; YANG et al., 2016). Yearla e Padmasree (2016) sugeriram que, além do aumento da propriedade antioxidante, a lignina nanoparticulada também pode oferecer proteção à radiação UV, possibilitando a sua aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos.

4.6 NANOPARTÍCULAS ANTIOXIDANTES

A oxidação é definida como (a) a perda de um ou mais elétrons de uma entidade molecular; (b) o aumento no número de oxidação de qualquer átomo em um substrato; (c) o ganho de oxigênio e/ou a perda de hidrogênio de substrato orgânico (I.U.P.A.C., 2014). Moléculas orgânicas em alimentos, cosméticos, e mesmo moléculas biológicas como lipídeos e proteínas sofrem degradação oxidativa, também denominada auto-oxidação ou peroxidação (VALGIMIGLI et al., 2018). Em sistemas biológicos, dependendo da habilidade celular em promover uma resposta antioxidante, a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS - *Reactive Oxygen Species*) formadas pode levar a danos irreversíveis em diversos tecidos (BETTERIDGE, 2000; LUCARINI; PEDULLI, 2010), responsáveis por diversas doenças em seres humanos como por exemplo diabetes, câncer e doenças degenerativas como Alzheimer e Parkinson (YIN et al., 2011).

A auto-oxidação ocorre em condições brandas e é uma reação radicalar em cadeia, composta por etapas de iniciação, propagação e terminação, ilustrada na FIGURA 10 para um substrato genérico RH.

Os radicais gerados na etapa de iniciação (Eq. 1) podem ser radicais hidroxila (HO^\bullet), alquila (R^\bullet), alcóxila (RO^\bullet) ou hidroperoxila (HOO^\bullet), dependendo das formas de iniciação: indução de luz/calor, clivagem homolítica de ligações fracas ou transferência de elétrons envolvendo metais de transição e hidroperoxídeos. Os radicais formados reagem com o substrato, geralmente abstraindo um átomo de hidrogênio e formando um novo radical alquila (R^\bullet) (Eq. 2).

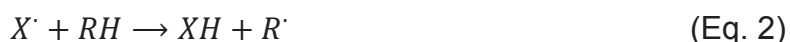
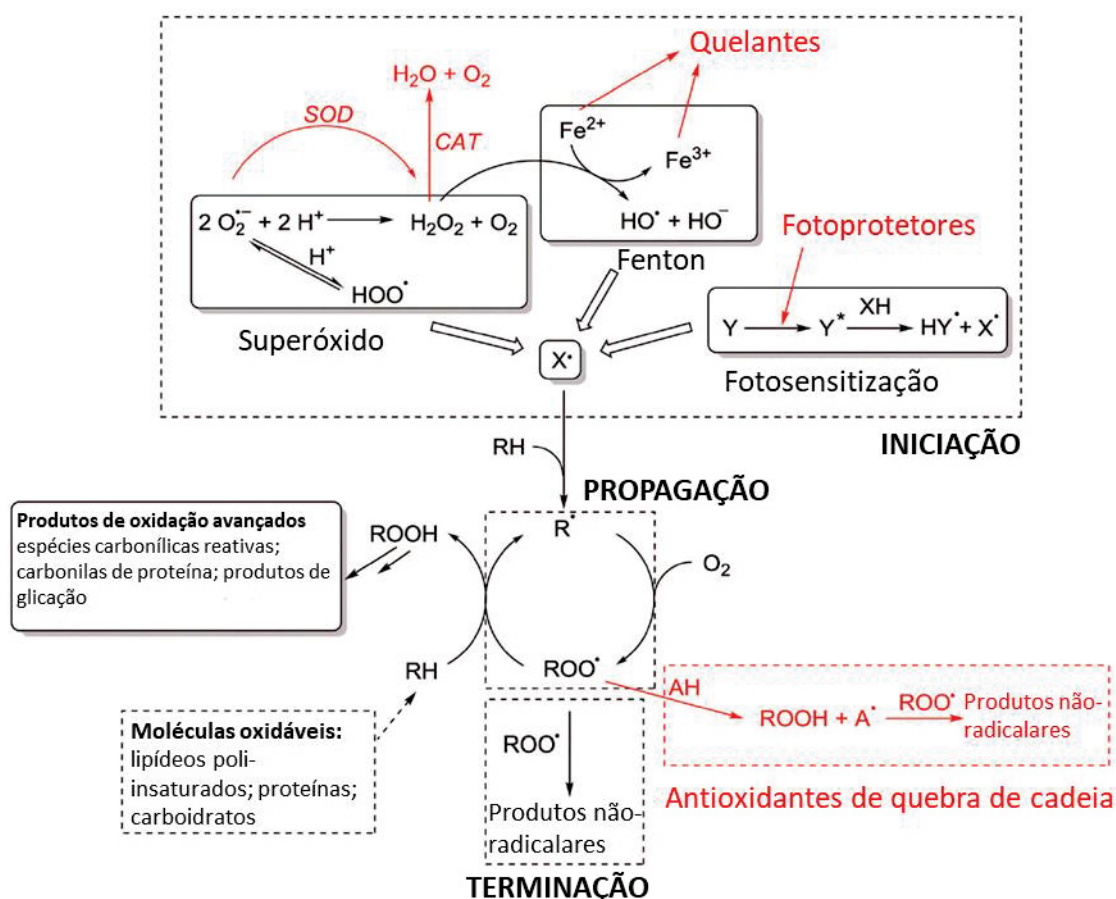


FIGURA 10 – MECANISMO DE REAÇÃO RADICALAR EM CADEIA DA AUTO-OXIDAÇÃO DE UM SUBSTRATO (RH) FORMANDO UM HIDROPERÓXIDO ALQUÍLICO (ROOH). X^\bullet , RADICAL; SOD, SUPERÓXIDO DISMUTASE; CAT, CATALASE; AH, ANTIOXIDANTE



FONTE: Adaptado de VALGIMIGLI et al. (2018)

A etapa de propagação é a etapa limitante e o radical formado reage com o oxigênio, formando o radical peroxila (Eq. 3), que então ataca o substrato formando novamente radicais alquila, estabelecendo assim a reação em cadeia

(Eq. 4). Por fim, a terminação ocorre quando dois radicais reagem entre si (Eq. 5) levando à formação de produtos não radicalares.



Antioxidantes são substâncias, moleculares ou nanomateriais que, quando adicionadas em pequenas quantidades a substâncias oxidáveis as protegem por redução ou inibição da auto-oxidação (VALGIMIGLI et al., 2018). Antioxidantes podem ser do tipo preventivo, atuando na redução da taxa da etapa de iniciação, como é o caso dos fotoprotetores. Antioxidantes também podem atuar na quebra de cadeia, competindo com as reações de propagação onde o radical é do tipo peroxila (ROO^{\cdot}). Para tal, um bom antioxidante de quebra de cadeia deve ser estável quando exposto ao ar, ter reatividade alta em relação ao radical (ROO^{\cdot}) e não resultar em um radical que propague por auto-oxidação. Compostos fenólicos são excelentes candidatos para a classe de antioxidantes de quebra de cadeia, pois podem capturar dois radicais ROO^{\cdot} por molécula (LUCARINI; PEDULLI, 2010). Além disso, as ligações O-H são fracas e possibilitam a transferência de um próton e de um elétron de forma concertada (Eq 6), sem a necessidade de um solvente prótico (SolvH) para fornecer o próton, além do antioxidante doador de próton (D) (Eq 7). Antioxidantes doadores de prótons (AH) podem ser compostos polifenólicos, como a lignina, e apresentam atividade antioxidante mesmo em meios como polímeros apolares e metanol (TIAN et al., 2017).



Vários compostos com propriedades antioxidantes, como Vitamina E, selênio, glutathione e polifenólicos são candidatos para redução de estresse oxidativo e combate a doenças associadas a esse fator (POPRAC et al., 2017). Apesar de possuírem atividade antioxidante, muitas dessas moléculas não são efetivas por serem metabolizadas antes de alcançarem os alvos biológicos de interesse, resultando em ineficácia e até mesmo efeitos indesejados (MORRY et

al., 2017). Nanopartículas antioxidantes, em contrapartida, podem ser compostos por moléculas inerentemente antioxidantes ou partículas inertes com recobrimento ou encapsulamento de ativos antioxidantes, sintetizadas para serem estáveis por mais tempo no meio aplicado e para atingir alvos biológicos específicos (VALGIMIGLI et al., 2018).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

A lignina técnica *kraft* em pó isolada pelo processo LignoBoost™ foi produzida em escala piloto por uma empresa cuja identidade não pode ser divulgada. Os demais solventes, reagentes e padrões de referência utilizados nesse trabalho foram de grau analítico, espectrométrico ou cromatográfico, dependendo da aplicação. A água purificada foi obtida por processo de destilação, ou ultrapurificada em sistema MilliQ (Millipore System), com resistividade elétrica de 18.2 MΩ cm. O tratamento estatístico dos dados foi realizado no software Prism da GraphPad Software (San Diego, Califórnia, EUA).

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Caracterização da lignina

5.2.1.1 Avaliação da umidade e do teor e composição das cinzas

A umidade da lignina foi determinada gravimetricamente, em quadruplicata, de acordo com procedimento adaptado da NREL/TP-510-42621 (SLUITER et al., 2008). As amostras foram secas em pesa-filtros destampados tarados até massa constante em estufa convectiva a 105 °C e o percentual de umidade foi calculado em relação a massa inicial da lignina utilizada no ensaio.

O teor de cinzas foi determinado gravimetricamente, em triplicata, de acordo com o procedimento adaptado da NREL/TP-510-42622 (SLUITER et al., 2004). As amostras foram pesadas em cadinhos de cerâmica tarados, carbonizadas previamente em uma chapa aquecedora para em seguida serem aquecidas por 12 h em mufla a 575 °C. As cinzas foram pesadas e o percentual de cinzas foi calculado em relação à massa seca da amostra.

Os elementos presentes nas cinzas (cálcio, potássio, magnésio, sódio, fósforo e enxofre) foram quantificados por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES – *Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry*) em Espectrômetro ICP-OES Modelo ICAP 6000 SERIES Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA) no Grupo de Química

Ambiental do Departamento de Química da UFPR. Os parâmetros instrumentais são apresentados no QUADRO 2.

QUADRO 2 – PARÂMETROS INSTRUMENTAIS ICP-OES PARA CARACTERIZAÇÃO DAS CINZAS DE LIGNINA LIGNOBOOST™

Radiofrequência	40 MHz
Potência de Radiofrequência (RF)	1,15 kW
Vazão do gás argônio	12 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,0 L min ⁻¹
Vazão do gás de nebulização	0,7 L min ⁻¹
Replicatas	3
Tempo de estabilização	Quartzo, vista axial
Tocha	Meio alcalino, DMF, piridina, DMSO
Sistema de nebulização	Nebulizador V-groove, câmara de nebulização concêntrica
Linhas analíticas	Ca 422,6 nm K 769,8 nm Mg 280,2 nm Na 589,5 nm P 213,6 nm S 180,7 nm

A amostra foi tratada seguindo o procedimento de digestão por sonicação proposto por Baika et al. (2016). Em triplicata, 100 mg de cinzas foram adicionados em tubos Falcon de 50 mL com 5 mL de água régia e 3 mL de água ultrapura. Após 30 min de descanso, as amostras foram sonicadas por 15 min e, por fim, adicionou-se água ultrapura até completar o volume máximo do tubo. As concentrações foram medidas em ppm e corrigidas de acordo com a diluição para a massa de amostra analisada.

3.2.1.2 Quantificação de lignina total e carboidratos residuais

A fração da lignina solúvel em ácido e os carboidratos residuais da lignina foram determinados pelo procedimento técnico NREL/TP-510-42618 (SLUITER et al., 2004b). O ensaio foi realizado em quadruplicata com $300,0 \pm 10,0$ mg de lignina tratada com $3,00 \pm 0,01$ mL de ácido sulfúrico 72% (m/m) em um tubo de vidro. Após a homogeneização da mistura com auxílio de um bastão de vidro, os tubos foram mantidos em banho-maria a 30 °C por 1 h e a cada 10 min as amostras foram maceradas utilizando o mesmo bastão. Posteriormente, o ácido foi diluído para 4% (m/m), o conteúdo transferido para frascos de autoclave e em seguida autoclavados

por 1 h a 121 °C e 103 kPa de vapor saturado. As amostras foram resfriadas até a temperatura ambiente para então serem filtradas a vácuo em cadinhos Gooch de porosidade média previamente tarados. O filtrado foi coletado para quantificação da lignina solúvel em ácido por espectrofotometria no ultravioleta (UV) e para determinação dos carboidratos por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM, em inglês *GC-MS – Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*), após derivatização a acetatos de alditol na presença de inositol como padrão interno, seguindo o procedimento proposto por Blakeney et al. (1983).

Para a derivatização, o volume final de fração solúvel foi avolumado para 100 mL. Esse volume foi neutralizado com adição de carbonato de cálcio até pH na faixa de 5 a 6. O material foi centrifugado e o sobrenadante foi liofilizado. O liofilizado foi ressuspensão em 5 mL de água e 50 µL de inositol (20 mg mL⁻¹) foram adicionados como padrão interno para quantificação. Em seguida, o material foi centrifugado novamente e 100 µL do sobrenadante foram coletados para a redução dos carboidratos com solução 20 mg mL⁻¹ de NaBH₄ em dimetilsulfóxido (DMSO) por 90 min a 40 °C em tubo rosqueado. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido acético glacial. A acetilação do material foi conduzida com 200 µL de metil-imidazol e 2 mL de anidrido acético por 10 min em temperatura ambiente.

Em seguida, foram adicionados 5 mL de água e 2 mL de diclorometano para extração, com posterior secagem do solvente com Na₂SO₄ anidro. Uma alíquota de 1,5 mL foi separada para análise, em cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão), modelo GC 2010 Plus, acoplado ao espectrômetro QP2010SE. A coluna, cuja fase estacionária é de 5% de fenilmetilsiloxano, foi a VF-5MS (Agilent J&W; 30 m x 0,25 mm; 0,25µm) e a amostra foi injetada no modo *split* em razão 1:10. A temperatura de injeção foi de 250 °C, a da interface foi de 260 °C e a da fonte de íons foi de 200 °C. A rampa de aquecimento iniciou-se em 180 °C e a temperatura foi imediatamente elevada até 230 °C a 5 °C min⁻¹, onde manteve-se por 2 min, somando um tempo total de análise de 12 min.

A identificação de cada carboidrato foi realizada através da injeção de padrões isolados para a determinação do tempo de retenção, bem como o método inicialmente empregou o detector no modo de varredura. Ao se analisar os espectros de massa dos padrões foi definido qual o melhor fragmento para a quantificação, atendendo aos requisitos de abundância e presença tanto em

pentoses quanto em hexoses. O fragmento selecionado foi o de m/z 115, e o método de aquisição alterado de varredura para modo de monitoramento de íon simples (SIM-*Single Ion Monitoring*). O método em modo SIM permite obter um cromatograma limpo, com menor presença de ruído e ganho de sensibilidade na placa de detecção.

A análise quantitativa foi baseada no método de padronização interna. Soluções de concentrações conhecidas dos padrões foram preparadas e os cálculos para a determinação do fator de resposta para cada componente monitorado foi determinado conforme a Eq. (8).

$$f_x = \frac{A_x \cdot C_{P.I.}}{A_{P.I.} \cdot C_x} \quad \text{Eq. (8)}$$

onde f_x é o fator de resposta para o carboidrato “x”, A_x é a área do carboidrato “x”, C_{PI} é a concentração do padrão interno (myo-inositol), A_{PI} área do padrão interno e C_x a concentração do carboidrato de interesse.

3.2.1.3 Análise elementar

A análise elementar, para determinação dos teores de carbono, nitrogênio, hidrogênio e enxofre, foi realizada no Departamento de Química da UFPR em equipamento Vario Micro Cube da Elementar (Langenselbold, Alemanha), em triplicata. A lignina técnica avaliada contém enxofre resultante do processo *kraft*, portanto, a quantificação desse elemento foi extremamente relevante para caracterizar os produtos provenientes desse processo.

3.2.1.4 Acetilação e solubilidade da lignina

A lignina (5 g) foi acetilada seguindo procedimento adaptado de Schorr et al. (2014) utilizando 100 mL de anidrido acético e piridina seca em razão volumétrica de 1:1. A reação foi conduzida em atmosfera de argônio por 24 h com agitação constante.

A separação do produto acetilado foi obtida por extração em mistura 9:1 (v:v) de diclorometano e metanol sob agitação por 30 min. O material foi lavado com bateladas com HCl 2 mol L⁻¹ e em seguida com solução aquosa saturada de NaHCO₃. Posteriormente, foram realizadas 4 lavagens com água destilada até que a fase aquosa apresentasse pH 7. A fase orgânica foi seca em Na₂SO₄ anidro por

2 h. O solvente foi removido em evaporador rotativo a 40 °C sob vácuo e o material foi seco em estufa a vácuo por 12 h a 40 °C.

A solubilidade da lignina, acetilada e não modificada, foi determinada de acordo com o procedimento adaptado de SAMENI et al. (2017a). Os solventes orgânicos testados foram: tetraidrofurano (THF), acetona, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol e água. Cerca de 100 mg de lignina seca foi adicionada à 10 mL de solvente orgânico em temperatura ambiente e mantidas por 10 min em banho de ultrassom. A fração insolúvel foi filtrada a vácuo usando cadinho filtrante de porosidade média. As amostras foram secas por 4 h a 50 °C e então pesadas. A fração solúvel da lignina foi calculada subtraindo a fração insolúvel da massa inicial.

3.2.1.5 Análises térmicas (TGA/DSC)

A análise termogravimétrica (em inglês TGA – *Thermal Gravimetric Analysis*) foi realizada em analisador Netzsch (Selb, Alemanha) modelo STA 449F3 em cadinho de cerâmica, com vazão de 40 mL min⁻¹ de N₂ e taxa de aquecimento de 20 °C min⁻¹ de 24 até 1000 °C.

A análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC – *Differential Scanning Calorimetry*) foi realizada em analisador Netzsch modelo DSC 200F3 em cadinho de alumínio e com vazão de 40 mL min⁻¹ de N₂ e taxas de aquecimento e de resfriamento de 10 °C min⁻¹, de acordo com o procedimento sugerido por SAMMONS et al. (2013). Uma primeira rampa de aquecimento, de 0 a 200 °C, foi realizada para retirada de solventes, umidade e demais impurezas. A segunda corrida, executada nas mesmas condições, foi utilizada para avaliação da temperatura de transição vítrea (T_g) da lignina.

3.2.1.6 Análise por FTIR-ATR

A análise qualitativa de grupos funcionais das ligninas, antes e após acetilação, foi realizada por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier pela técnica de Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR em inglês *Fourier-transform infrared spectroscopy - Attenuated total reflection*) no Departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), em equipamento Varian 640-IR com cristal de seleneto de zinco. Os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 600 cm⁻¹, no modo de absorvância, com resolução de 2 cm⁻¹ e 128 scans.

3.2.1.7 Caracterização química via RMN ^{31}P

O método tradicional inicialmente proposto por Granata e Argyropoulos (1995) para a determinação do teor de hidroxilas fenólicas e alifáticas e de carboxilas em amostras de lignina foi adaptado de acordo com as sugestões de Balakshin e Capanema (2015). As ligninas não modificada e acetilada (30 mg) foram solubilizadas em 600 μL de uma mistura 1,6:1 ($v v^{-1}$) de piridina e CDCl_3 , 100 μL de solução de agente de relaxação acetilacetato de cromo (III) ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) e 100 μL do padrão interno ciclohexanol ($0,19 \text{ mol L}^{-1}$). O reagente fosfitilante 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxafosfolano (TMDP, 80 μL) foi então adicionado às misturas. As soluções foram agitadas por 30 min até solubilização e depois transferidas para tubos de análise de RMN, com um capilar contendo H_3PO_4 utilizado como referência. Os espectros foram adquiridos em espectrômetro Bruker Ascend 600 MHz no Departamento de Bioquímica da UFPR, com 1 s de *delay* (D1) e 0,34 s de tempo de aquisição, 2048 varreduras, TD igual a 65536. As áreas dos deslocamentos químicos atribuídos à fosfitilação de hidroxilas de unidades de siringila mais unidades condensadas, guaiacila, e carboxilas foram integradas e a quantificação foi realizada comparando com a área integrada do deslocamento correspondente ao ciclohexanol fosfitilado, que foi adicionado em quantidade conhecida.

3.2.1.8 Caracterização química por RMN 2D ^1H - ^{13}C HSQC

O mapa da correlação ^1H - ^{13}C HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy*) da lignina permite a análise semiquantitativa de sua composição química, sendo uma das técnicas mais utilizadas para medir a abundância relativa de diferentes tipos de ligação e a razão S:G:H de ligninas. Nesse trabalho, 10 mg de lignina não modificada foram solubilizados em 500 μL de $\text{DMSO-}d_6$ contendo 100 μL de solução de agente de relaxação acetilacetato de cromo (III) ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$). O espectro foi adquirido no espectrômetro Bruker Ascend 600 MHz do Departamento de Bioquímica da UFPR, utilizando sonda criogênica de nitrogênio, 2 s de *delay* (D1) com incremento de 40 μs , 32 DS (*Dummy scans*), 2 varreduras, TD igual a 1k e 256 incrementos, 0,05 s e 0,005 s de tempo de aquisição para os núcleos de ^1H e ^{13}C , respectivamente.

Os espectros foram identificados e integrados comparativamente a diversos dados apresentados na literatura (CONSTANT et al., 2016; CRESTINI et al., 2017; FERNÁNDEZ-COSTAS et al., 2014; RENCORET et al. 2009; DEL RÍO et al., 2012; SETTE et al., 2011). A correlação correspondente ao solvente (DMSO-d6) foi definida como referência interna, cujos deslocamentos δ_C e δ_H foram 39,6 e 2,49, respectivamente. Seguindo as atribuições dos deslocamentos químicos de Del Río et al. (2012), as abundâncias relativas foram estimadas na região alifática oxigenada (δ_C/δ_H 50,0-95,0/2,5-6,0 ppm) utilizando as correlações $C_\alpha-H_\alpha$ de forma a evitar possíveis interferências de acoplamentos homonucleares. Na região aromática (δ_C/δ_H 90,0-155,0/6,0-8,0 ppm), as correlações C_2-H_2 foram utilizadas para estimar a abundância relativa de unidades siringila (S), guaiacila (G) e estilbeno.

3.2.1.9 Determinação da massa molar por cromatografia de permeação em gel (GPC)

A determinação da massa molar média da lignina é diretamente relacionada à sua reatividade e propriedades físico-químicas, tornando-se um parâmetro de elevada importância para futuras aplicações do material (KUBO et al., 1996; YOSHIDA et al., 1990). A massa molar ponderal média aparente (M_w), a massa molar numérica média aparente (M_n) e a dispersão ou \bar{D} (M_w/M_n) das amostras de lignina foram determinadas por GPC (Cromatografia de permeação em gel, em inglês *Gas Permeation Chromatography*) utilizando a lignina não-modificada e a lignina acetilada para melhor solubilidade no solvente de análise. Apesar de a lignina analisada apresentar solubilidade semelhante quando acetilada ou não, para fins de comparação com as análises comumente encontradas na literatura, ambas foram analisadas nas mesmas condições. As duas amostras foram solubilizadas em tetraidrofurano (THF) de grau HPLC estabilizado com 0,125% de hidroxitolueno butilado (BHT) a 10 mg mL⁻¹ e filtradas em filtro de nylon de 0,45 μ m (NARON et al., 2017). A análise foi feita em sistema cromatográfico Waters (Milford, Massachussets, EUA) com bomba HPLC isocrática modelo 1515, amostrador automático modelo 2707 e detector de índice de refração modelo 2414, usando uma pré-coluna TSK Gel Guard HL-L e colunas TSK G3000 HxL, TSK Gel G2000 HxL e TSK Gel G1000 HxL em série. A fase móvel empregada foi THF a 40 °C a uma vazão de 1 mL min⁻¹, e o método de calibração das massas nas amostras

foi realizado através de curva de eluição de padrões de poliestireno no intervalo de 370 a $2,89 \times 10^6$ e para melhor definição da curva na região de baixa massa molar, foram incluídos tolueno ($92 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) e ácido *p*-cumárico ($164 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). As constantes de Mark-Houwink para poliestireno em THF a 40°C foram de $k = 0,0001179$ e $\alpha = 0,74$, e o *software* Empower3 foi empregado para realização dos cálculos de calibração e controle.

5.2.2 Produção e caracterização de nanopartículas de lignina

As metodologias de preparo de nanopartículas de lignina podem ser aplicadas tanto à lignina industrial não modificada como à lignina industrial após o procedimento de acetilação. Neste trabalho, apenas a lignina industrial não-acetilada foi testada para a produção das nanopartículas. Os preparos foram realizados com as amostras sem qualquer procedimento de purificação, apenas secagem a 60°C a vácuo por 4 h.

5.2.2.1 Nanoprecipitação por diálise

O método selecionado como ponto de partida para a produção das nanopartículas de lignina foi proposto por LIEVONEN et al. (2016). Esse método não exige nenhuma modificação química da lignina utilizada e produz nanopartículas esféricas com poucas irregularidades, sendo que os tamanhos de partículas obtidos são diretamente proporcionais às concentrações de lignina iniciais, sugerindo um mecanismo de formação de nucleação e crescimento.

As concentrações de lignina no solvente orgânico (THF) foram de 0,5, 1, e 2 mg mL^{-1} . Cada solução foi filtrada em filtro de PTFE (politetrafluoroetileno) com porosidade de $0,45 \mu\text{m}$ para em seguida ser inserida em um tubo de diálise composto por membrana de celulose com corte de 12,4 kDa (D0530-100ft, Sigma-Aldrich). O tubo fechado foi imerso em água destilada e mantido sob agitação por 24 h em temperatura ambiente ($20 \pm 3^\circ\text{C}$), sendo que a água foi renovada na primeira hora de 15 em 15 min, nas 3 h seguintes de 30 em 30 min e nas 6 h seguintes de hora em hora.

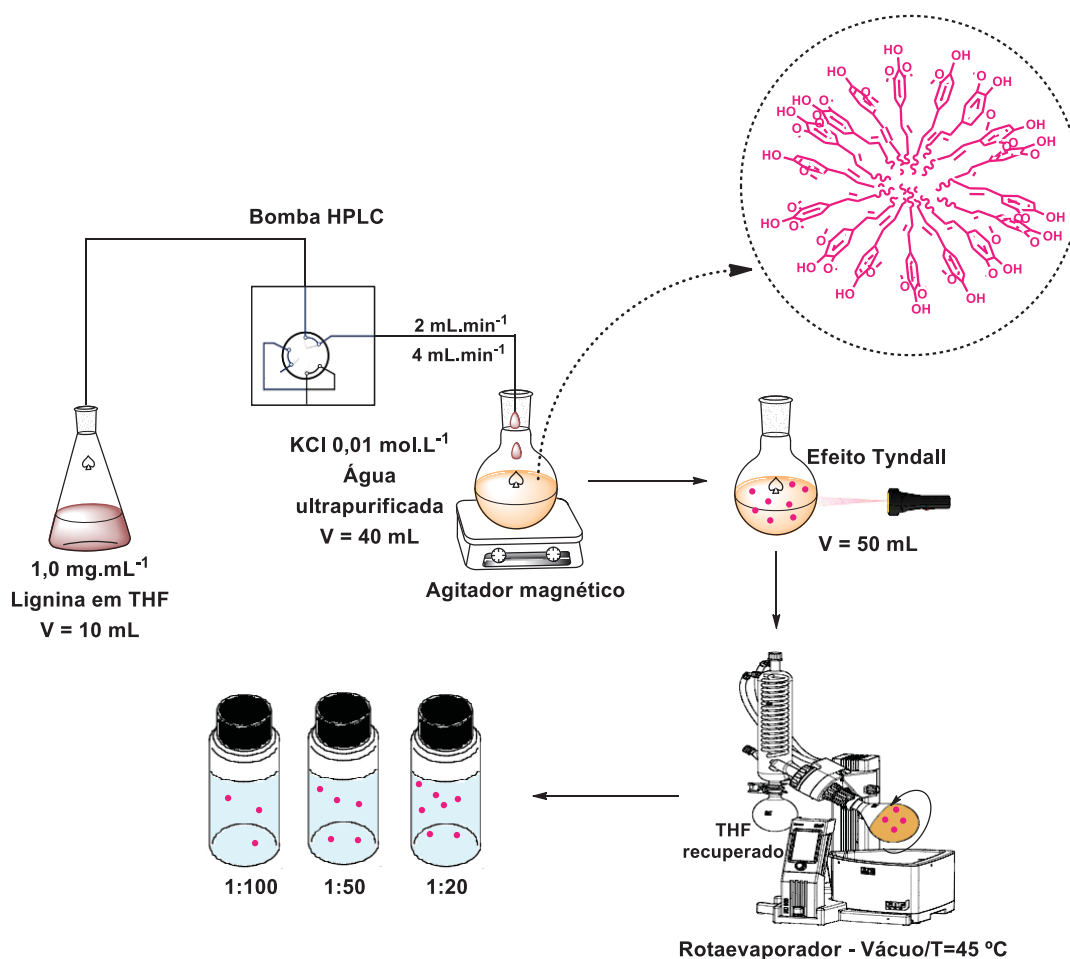
5.2.2.2 Nanoprecipitação por gotejamento

Na metodologia definida nesse trabalho para a produção de nanopartículas de lignina (LNPs) por nanoprecipitação em antissolvente, a concentração da lignina

em THF foi fixada em 1 mg mL^{-1} em volume de 10 mL e uma solução de KCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em água ultrapurificada foi empregada como antissolvente, em volume de 40 mL. Visando a produção de nanopartículas de tamanhos diferentes, foram aplicadas duas velocidades de gotejamento da solução de lignina ($2 \text{ e } 4 \text{ mL min}^{-1}$) sob agitação magnética constante do antissolvente, até concentração final de 80% ($v v^{-1}$) de antissolvente (volume final igual a 50 mL).

O esquema da metodologia de síntese de nanopartículas por gotejamento de solvente (THF) em antissolvente (água) é apresentado na FIGURA 11. A inversão do gotejamento, ou seja, adição do antissolvente ao solvente com lignina solubilizada foi realizada para esse sistema, porém, a formação de agregados macroscópicos inviabilizou essa metodologia.

FIGURA 11 – ESQUEMA DA METODOLOGIA DE NANOPRECIPITAÇÃO EM ANTISSOLVENTE POR GOTEJAMENTO PARA PRODUÇÃO DE LNPS (NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA).



FONTE: A autora (2020)

As amostras produzidas foram testadas preliminarmente com luz laser vermelha (laser pointer) com comprimento de onda (λ) de $\approx 623\text{nm}$, para verificar a ocorrência do efeito Tyndall, descrito como o espalhamento de luz gerado por uma suspensão coloidal (KRAEMER; DEXTER, 1927). Em seguida, o solvente (THF) foi evaporado por um período entre 2 e 3 h em um evaporador rotativo sob vácuo, a 45°C .

Após a síntese, a dispersão de nanopartículas, com concentração em torno de $0,25\text{ mg mL}^{-1}$, foi estabilizada em diluições de 1:20, 1:50 e 1:100 para análises de potencial Zeta, espalhamento de luz laser dinâmico (DLS – *Dynamic Light Scattering*) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM – *Transmission Electronic Microscopy*), respectivamente. O material resultante possui tendência de floculação ao longo do tempo, portanto, a diluição proporciona a redução da probabilidade de interação entre as nanopartículas devido ao movimento browniano.

5.2.3 Caracterização das nanopartículas

5.2.3.1 Formação, raio hidrodinâmico e estabilidade

As nanopartículas foram caracterizadas de acordo com metodologia proposta por Lu et al. (2012). Os equipamentos necessários para essas análises estão localizados no Laboratório Biopol – Maria Rita Sierakowski do Departamento de Química da UFPR. O raio hidrodinâmico aparente das partículas foi medido por DLS (*Dynamic Light Scattering* – espalhamento de luz dinâmico) no equipamento BrookHaven Instruments (Holtsville, Nova Iorque, EUA) modelo NANO DLS *Particle Size Analyzer* operando com laser He-Ne a 15 mW, à 90° e comprimento de onda de 632,8 nm. A diluição ótima, determinada como a maior diluição em que a concentração de partículas não afeta o raio hidrodinâmico, foi definida experimentalmente e fixada em 1:50 para todos os experimentos. Foram realizadas nove corridas de análise para cada amostra, avaliando os resultados de número de nanopartículas. Para análise de estabilidade, foram realizadas análises das partículas dispersas em água em tempos de estocagem de 1, 15 e >47 dias.

Para normalização da força iônica do meio e evitar flutuações nas medidas de potencial Zeta (ζ), as nanopartículas foram sintetizadas diretamente em solução em água ultrapura de KCl $0,01\text{ mol L}^{-1}$. A titulação potenciométrica foi realizada com

HCl 0,01 mol L⁻¹ até pH 3 e NaOH 0,01 mol L⁻¹ até pH 9, com intervalos de 60 s entre adições de ácido ou base para estabilização do sistema. Essas medidas foram realizadas em equipamento Stabino *Particle Charge Mapping*, em diluição ótima de 1:20 definida experimentalmente.

5.2.3.2 Análise de morfologia e tamanho de partícula por técnicas de microscopia

Para análise microscópica, as nanopartículas dispersas em água foram gotejadas sobre uma grade de cobre com película de *Formvar* e mantidas em dessecador por 24 h em temperatura ambiente. Análises de TEM foram feitas em microscópio eletrônico JEOL JEM 1200EX-II no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR, com resolução de 0,5 nm e magnificações de até 600 kX. As imagens foram obtidas através de câmera CCD Gatan (BioScan) e de câmera de alta resolução CCD Gatan (Orius SC1000B).

5.2.3.2 Avaliação do potencial antioxidante das nanopartículas de lignina

A análise do potencial antioxidante das nanopartículas foi realizado pelo método ABTS [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico], um método indireto baseado na reação do antioxidante com um radical estável, cuja mitigação pode ser acompanhada via técnicas espectrofotométricas (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2019; VALGIMIGLI et al., 2018).

O procedimento foi adaptado de Re et al. (1999), com geração do radical ABTS^{•+} previamente ao ensaio pela adição de solução 7 mM de ABTS à solução 2,45 mM de persulfato de potássio (KPS) em proporção volumétrica 1:1. A mistura foi mantida em temperatura ambiente e protegida da luz por 24 h, até a completa formação de radical. A solução com o radical formado foi diluída até absorvância igual a 1,0 em comprimento de onda de 734 nm. O solvente utilizado para as análises foi o tampão fosfato salino (PBS – *Phosphate Buffer Solution*) pH 7,4. A solução com o radical foi adicionada à solução com antioxidante ou branco (1:3) em microplaca de 96 poços com volume final de 280 µL.

A absorvância foi medida em temperatura ambiente em tempos de 1, 10, 20, 30 e 40 min e foi utilizada para cálculo da inibição do radical pelo antioxidante, em porcentagem, pela Eq. (9), com correção do branco das amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A atividade antioxidante das nanopartículas foi avaliada nas concentrações de 1, 5 e 10 µg mL⁻¹.

$$Inibição (\%) = \frac{Absorvância_{ABTS} - Absorvância_{amostra}}{Absorvância_{ABTS}} \cdot 100 \quad \text{Eq. (9)}$$

O padrão antioxidante utilizado como referência foi o Trolox® (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), um análogo da Vitamina E solúvel em água. Uma curva padrão de Trolox® foi construída nas concentrações de 1, 4, 5, 8 e 10 µg mL⁻¹, para cálculo da EC₅₀ (Concentração efetiva de 50%) pela linearização da curva e do TEAC (Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox, em inglês *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) pela Eq. (10).

$$TEAC = \frac{EC50_{Trolox}}{EC50_{amostra}} \quad \text{Eq. (10)}$$

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados em duas partes distintas: a primeira parte se refere à caracterização da lignina em relação a sua composição química, solubilidade, massa molar e quantificação relativa de grupos funcionais como hidroxilas aromáticas e alifáticas e de unidades siringila, guaiacila e outras presentes na sua estrutura da lignina. A segunda parte se refere à produção e caracterização das nanopartículas de lignina em relação a sua morfologia, tamanho, estabilidade e atividade antioxidante.

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA LIGNINA

Os resultados de caracterização da lignina *kraft* LignoBoost™ de eucalipto são apresentados na TABELA 2 e contemplam as análises de teor de umidade, cinzas (e elementos nela presentes), lignina total (solúvel e insolúvel em ácido), teor de carboidratos e análise elementar (CHNS).

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DA LIGNINA *KRAFT* LIGNOBOOST™ DE EUCALIPTO.

Composição	Componente (% m/m)	
	Nesse trabalho	Literatura***
Umidade	4,2 ± 0,2	<10
Cinzas	1,0 ± 0,1	0,01-1,4
Ca	84,2 ± 0,3*	1-200**
K	23,1 ± 0,3*	1-100**
Mg	4,7 ± 0,1*	-
Na	1,77 ± 0,03*	100-400**
P	0,7 ± 0,2*	-
S	124 ± 1*	-
Lignina total	90,4	95-98
Lignina insolúvel em ácido	87 ± 1	-
Lignina solúvel em ácido	3,8 ± 0,3	-
Carboidratos totais	12,75	traços
Ara	0,7 ± 0,1	-
Xyl	8,9 ± 0,8	-
Glc	1,7 ± 0,2	-
Gal	1,4 ± 0,1	-
Total (base seca)	104,1	-

Composição	Componente (% m/m)	
	Nesse trabalho	Literatura***
C	62,2 ± 0,3	65,1
H	5,82 ± 0,09	5,8
N	0,08 ± 0,01	0,1
S	2,35 ± 0,03	2,5
O (calculado)	29,5 ± 0,4	26,1

* Resultados em ppm; ** Resultados em ‰; *** Tomani (2010) e Tomani et al. (2011)

A caracterização específica de lignina LignoBoost™ oriunda de folhosas é escassa na literatura, o que dificulta a realização de uma análise comparativa dos resultados obtidos. Além dos valores apresentados em comparativo na tabela acima, cujo principal autor é o desenvolvedor do processo LignoBoost™, Ponomarenko et al. (2014) fracionaram e caracterizaram ligninas LignoBoost™ de folhosas e obtiveram valores de $97,4 \pm 0,5$ % de lignina total e $2,50 \pm 0,04$ de carboidratos.

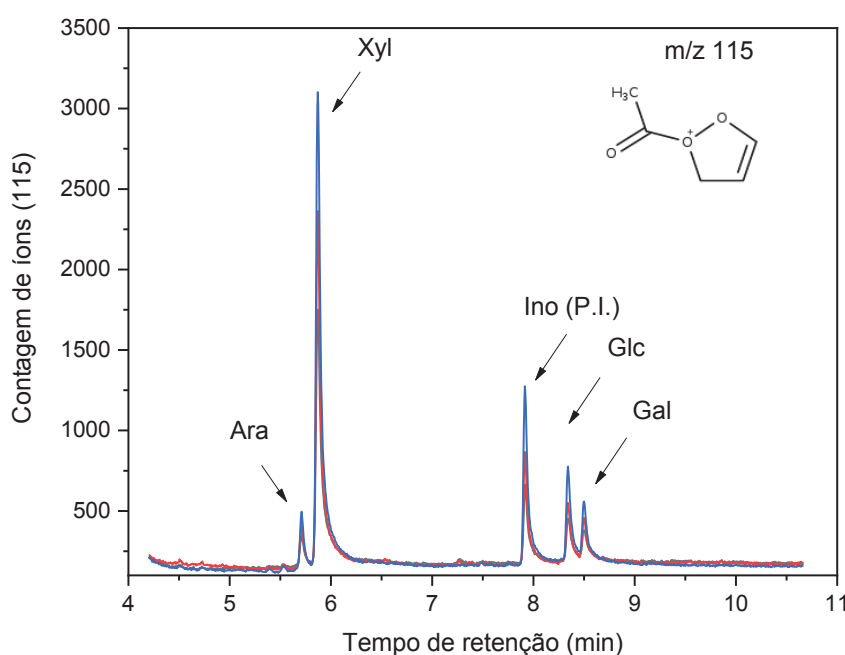
O teor de umidade da amostra recebida (aproximadamente 4%) indica a eficiência da etapa de secagem do material após o seu processo de purificação em escala piloto. Os teores de metais alcalinos e alcalino-terrosos (Ca, K e Na) foram comparativamente menores e a análise elementar foi semelhante aos resultados obtidos por Tomani (2010) e Tomani et al. (2011). A maior discrepância encontrada está relacionada justamente à eficiência do processo de purificação: os carboidratos foram encontrados em teores muito mais elevados do que os esperados para o processo, conforme antecipado por autores como Ponomarenko et al. (2014).

Os carboidratos residuais foram caracterizados em procedimento de hidrólise da lignina e derivatização do hidrolisado em acetato de alditol para análise por CG-EM (FIGURA 12).

Dentre as hemiceluloses presentes em espécies folhosas, as glucuronoxilanas estão presentes em maior proporção, o que justifica a maior presença destas nos carboidratos residuais da lignina caracterizada nesse estudo (KOSHIJIMA; WATANABE, 2003). A alcalinidade do processo de polpação *kraft* afeta a solubilidade dessas xilanas, particularmente devido à remoção de seus substituintes e cadeias laterais, promovendo sua redeposição parcial sobre as fibras de celulose (NIEMINEN et al., 2014). No entanto, parte dessas xilanas é

solubilizada no licor negro e precipitada junto com a lignina, permanecendo estáveis como parte de complexos lignina-carboidrato (BRÄNNVALL, 2017). A redução do pH para isolamento da lignina a partir do licor negro pode resultar na diminuição do teor de carboidratos do material precipitado e o aumento da força iônica no meio favorece a precipitação de fragmentos de xilanas junto à lignina (ZHU et al., 2015). Embora informações sobre as condições de polpação e precipitação não tenham sido fornecidas, é possível que parâmetros de processo, como o pH e a força iônica, tenham resultado no alto teor de carboidratos que está mensurado na TABELA 2.

FIGURA 12 – QUANTIFICAÇÃO POR PADRONIZAÇÃO INTERNA DE CARBOIDRATOS NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITOIS EM LIGNINA LIGNOBOOST DE EUCALIPTO, EMPREGANDO CG-MS COM MONITORAMENTO DO ÍON CORRESPONDENTE AO FRAGMENTO m/z 115 (ANÁLISES EM TRIPLICATA).



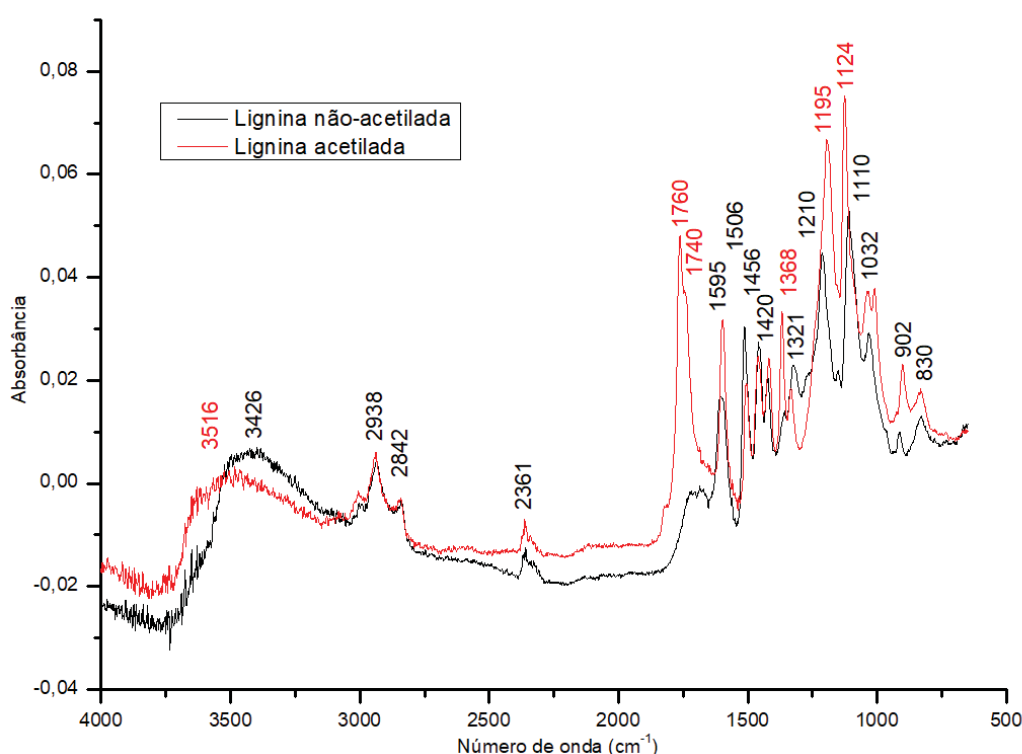
FONTE: A autora (2020)

A acetilação é um procedimento comumente realizado para caracterização da lignina, em que grupos hidroxila são substituídos por grupos acetila para aumentar a sua solubilidade em solventes orgânicos e facilitar a realização de análises por ressonância magnética nuclear e cromatografia de permeação em gel. Seguindo o procedimento de Schorr et al. (2014), a obtenção da lignina acetilada após a evaporação total dos solventes foi dificultada pela formação de uma película aderente nas paredes do balão. O problema foi solucionado pela evaporação

parcial do solvente e transferência da amostra concentrada para uma placa de Petri, onde permaneceu por 2 h em capela. Após esse período, as placas foram secas em estufa a vácuo por 12 h. Metade da dispersão de lignina acetilada foi descartada pois manteve-se aderida à superfície da placa de Petri; portanto, não foi possível calcular o rendimento mássico da reação. Com esse procedimento, foram obtidos 2,5 g de material acetilado a partir de 5 g da lignina de origem.

A análise por FTIR-ATR foi utilizada para análise qualitativa dos grupos funcionais presentes na lignina e confirmação de seu grau de acetilação. A análise do espectro de ^{31}P RMN da lignina antes e após acetilação também foi um bom indicativo do sucesso da reação e esta será discutida com mais detalhes juntamente aos demais resultados de RMN. O espectro no infravermelho é apresentado na FIGURA 13 e a atribuição das bandas encontra-se na TABELA 3.

FIGURA 13 – ESPECTRO NO INFRAVERMELHO (FTIR-ATR) DAS AMOSTRAS DE LIGNINA NÃO MODIFICADA E MODIFICADA (RESOLUÇÃO 2 cm^{-1} , 128 SCANS)



FONTE: A autora (2020)

As bandas mais representativas da lignina (1506 cm^{-1} e 1420 cm^{-1}), associadas à estruturas guaiacílicas, foram observadas com um pequeno deslocamento em relação ao relatado na literatura (1510 cm^{-1} e 1425 cm^{-1})

(ABDELAZIZ; HULTEBERG, 2017). A região de 3410-3460 cm^{-1} é associada a deformações axiais (ν) de O-H em grupos hidroxila (fenólicos e alifáticos), cuja intensidade é reduzida após o procedimento de acetilação.

TABELA 3 – ATRIBUIÇÃO DAS BANDAS DE FTIR-ATR DAS LIGNINAS ACETILADA E NÃO MODIFICADA.

Número de onda/ cm^{-1}	Vibração	Atribuição
3516	ν de O-H	OH (fenólica e alifática) associada à água
3426	ν de O-H	OH (fenólica e alifática)
2938	ν_{as} de C-H	CH_3 e CH_2
2842	ν_{s} de C-H, ν de C-H	CH_3 e CH_2 , OCH_3
1760	ν de C=O	OAc fenólico
1740	ν de C=O	OAc alifático
1595	ν de C-C, ν de C=O, δ de C-H	Anel aromático (siringila)
1506	ν de C-C, δ de C-H	Anel aromático (guaiacila)
1456	δ_{as} de C-H	CH_3 e CH_2
1420	δ de C-H; ν de C-C	Anel aromático
1368	δ_{as} de C-H	OCH_3
1321	ν de C-O	Aneis aromáticos condensados (siringila e guaiacila)
1210-1295	ν de C-O	Anel aromático (metoxila e fenila, típico de siringila)
1195	ν de C-O-C	Acetila em anel aromático
1124	ω de C-H; ν de C-C; ν de C=O	Anel aromático (típico de siringila), Alcoóis secundários, anidrido acético
1110-1032	δ de C-H; δ de C-O	Anel aromático, alcoóis primários, éter
902-830	δ de C-H	Anel aromático

FONTES: POPESCU et al. (2006), ABDELAZIZ; HULTEBERG (2017), CACHET et al. (2014), FAIX et al. (1994), SAMENI et al. (2017b), BYKOV (2008).

Popescu et al. (2006) indicaram que o deslocamento observado da banda de em 3516 cm^{-1} é resultante do ν em O-H de hidroxila em água fracamente adsorvida por ligação de hidrogênio, sugerindo, portanto, uma redução na presença de grupos hidroxila. Um aumento significativo na intensidade da banda de deformação angular (δ) em 1368 cm^{-1} é observado na amostra acetilada e esse está relacionado à presença de grupos metoxila, assim como a banda observada

em 1195 cm^{-1} . O indício mais significativo da reação de acetilação da lignina é o surgimento de intensidade da banda de ν em 1760 cm^{-1} e o ombro associado em 1740 cm^{-1} , correspondentes ao ν de C=O em grupamentos acetila ligados à hidroxilas fenólicas e alifáticas, respectivamente (FAIX et al., 1994).

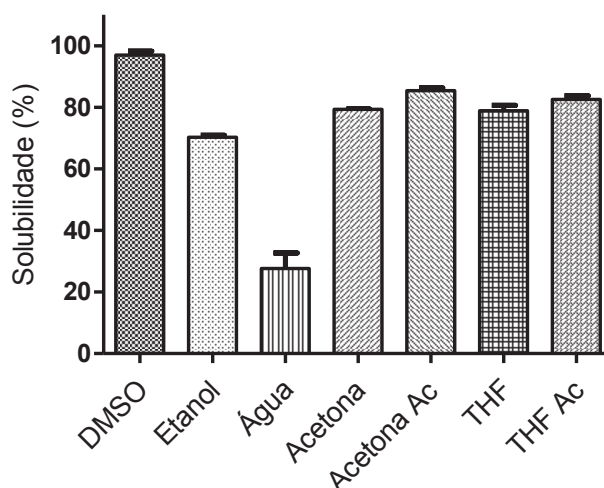
Os espectros obtidos apresentam bandas típicas de lignina *kraft* de folhosas e sugerem que a reação de acetilação foi realizada satisfatoriamente. Além disso, há pouca evidência da presença de contaminações oriundas da reação de acetilação, como as bandas usualmente atribuídas à presença de anidrido acético (e.g., 1823 , 1121 , 995 e 886 cm^{-1}). Em 1124 cm^{-1} há uma banda que também pode ser associada às vibrações estruturais no anel aromático de unidades siringílicas, segundo atribuições relatadas na literatura (CACHET et al., 2014).

Os resultados de solubilidade da lignina LignoBoost™ são apresentados em porcentagem na FIGURA 14. As amostras identificadas como “Acetona Ac” e “THF Ac” são referentes à análise da lignina acetilada nesses solventes. A solubilidade da lignina em solventes orgânicos depende de sua massa molar e da presença de hidroxilas alifáticas. No entanto, até o momento, não foi possível estabelecer uma correlação direta da solubilidade de acordo com a teoria de Hildebrand (SAMENI et al., 2017a). Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$) e teste Tukey *post hoc* ($p < 0,001$) e não foram constatadas diferenças significativas entre a solubilidade das ligninas acetilada e não-modificada em THF e acetona. A alta solubilidade da lignina em DMSO levou à escolha desse solvente para as análises de RMN apresentadas adiante. Por outro lado, a baixa solubilidade da lignina em água e a boa solubilidade nos outros solventes orgânicos, com desempenho inferior para o etanol, norteou a escolha do sistema solvente e antissolvente aplicado na metodologia de nanoprecipitação para síntese das nanopartículas.

O procedimento de acetilação da lignina é tradicionalmente utilizado para aumentar a solubilidade do material em THF para análise da distribuição em massas molares aparentes do material por GPC (SCHORR et al., 2014). Os resultados encontrados para a solubilidade, no entanto, não seguiram essa tendência e foram contrários aos encontrados por Sameni et al. (2017a), que observaram um aumento significativo da solubilidade da lignina acetilada em relação à não modificada. Especificamente para ligninas *kraft* de eucalipto, as solubilidades em THF das ligninas não-modificada e acetilada foram de

aproximadamente 80% e 82%, respectivamente. Em acetona, a lignina não modificada apresentou solubilidade de 79% e a acetilada, de 85%.

FIGURA 14 – SOLUBILIDADE DA LIGNINA NÃO MODIFICADA E ACETILADA (100 mg EM 10 mL) EM DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS, EMPREGANDO TEMPERATURA AMBIENTE, 10 min EM BANHO DE ULTRASSOM, FILTRAÇÃO A VÁCUO EM FILTRO DE POROSIDADE MÉDIA E SECAGEM POR 4 h A 50 °C (ANOVA, $p < 0,05$; TUKEY $p < 0,001$)



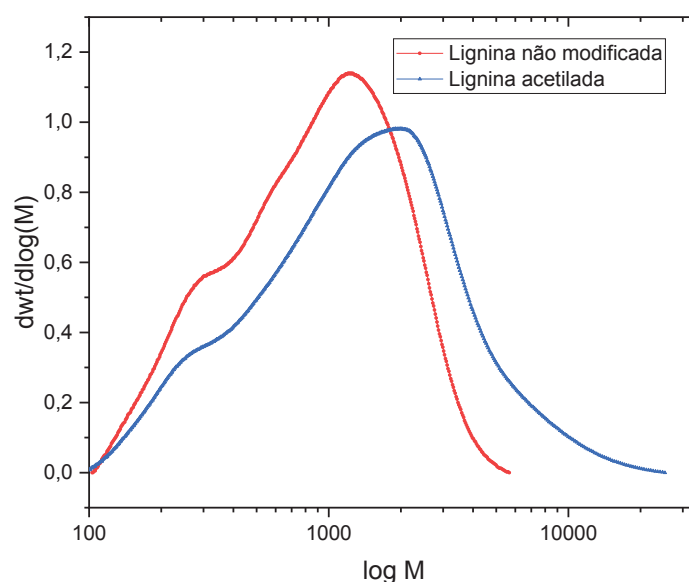
FONTE: A autora (2020)

Os resultados de solubilidade indicaram que a lignina pode ser analisada por GPC sem modificação química, reduzindo erros associados à perda de material durante as etapas de lavagem do material acetilado (BAUMBERGER et al., 2007). Portanto, para facilitar a análise comparativa desses procedimentos, o material foi analisado nessas duas condições,

A análise por GPC da distribuição em massas molares aparentes da lignina LignoBoost™ (FIGURA 15) resultou em valores de $M_w = 1104 \text{ g mol}^{-1}$ e $M_n = 592 \text{ g mol}^{-1}$ com $\bar{D} = 1,87$ para a lignina não acetilada e $M_w = 2015 \text{ g mol}^{-1}$ e $M_n = 798 \text{ g mol}^{-1}$ com $\bar{D} = 2,52$ para a lignina acetilada. Os valores obtidos para a análise da lignina acetilada foram então corrigidos devido à substituição das hidroxilas (quantificadas via RMN ^{31}P , com resultados detalhados adiante) por grupos acetila, com aumento de massa molar unitário de 42 g mol^{-1} . Os valores corrigidos foram de $M_w = 1902 \text{ g mol}^{-1}$ e $M_n = 753 \text{ g mol}^{-1}$. Vale ressaltar que a acetilação não alterou significativamente o perfil de análise da lignina não acetilada, e a concordância de valores entre as duas técnicas, considerando a correção da acetilação, chegou a aproximadamente 94%. Já a dispersão elevada observada é comum em ligninas industriais, sendo recorrente a detecção de massas molares

mais altas para ligninas oriundas de folhosas (BRODIN et al., 2009; PONOMARENKO et al., 2014).

FIGURA 15 – DISTRIBUIÇÃO EM MASSAS MOLARES APARENTES DA LIGNINA LIGNOBOOST DE EUCALIPTO ANTES E APÓS A REAÇÃO DE ACETILAÇÃO, OBTIDA POR CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL NA CONCENTRAÇÃO DE 10 mg mL⁻¹ EM THF.



FONTE: A autora (2020)

A comparação entre as massas molares aparentes de ligninas técnicas é dificultada por diferenças entre os seus processos industriais de obtenção, com variação no grau de fragmentação devido às condições de processo, bem como por variações nas condições de análise cromatográfica e de preparo de amostra (SAMENI et al., 2017a). Schorr et al. (2014) relataram massas molares aparentes de ligninas acetiladas oriundas de processos de pirólise, *kraft* e soda, com maiores valores obtidos para as ligninas *kraft* ($M_w = 4549 \text{ g mol}^{-1}$; $M_n = 1248 \text{ g mol}^{-1}$; $\bar{D} = 3,65$). Ponomarenko et al. (2014) também observaram massas molares aparentes elevadas para lignina *kraft* de espécies folhosas *kraft* ($M_w = 4790 \text{ g mol}^{-1}$; $M_n = 421 \text{ g mol}^{-1}$; $\bar{D} = 11,4$). Os valores obtidos nesse trabalho são mais próximos de valores obtidos para ligninas do tipo *organosolv*, cuja estrutura é drasticamente modificada pelo processo de extração (CONSTANT et al., 2016). A massa molar aparente obtida nesse trabalho pode ser um indicativo de que o processo de polpação ao qual foi submetido o material de origem (cavacos de eucalipto) apresenta condições agressivas, resultando em despolimerização devida

principalmente à clivagem de ligações do tipo aril-éter.

A espectroscopia de ^{31}P RMN oferece uma forma rápida de quantificar e diferenciar hidroxilas fenólicas e alifáticas em amostras de lignina por meio da identificação das estruturas fosfitiladas correspondentes. Além disso, essa técnica oferece uma melhor resolução entre deslocamentos químicos quando comparada à espectroscopia por ^1H RMN (PU et al., 2011).

A fosfitilação da lignina para análise por ^{31}P RMN com a utilização de ciclohexanol como padrão interno permitiu quantificar os seus teores de hidroxilas fenólicas e alifáticas, que foram comparados aos valores obtidos por Ahvazi et al. (2016) para lignina *kraft* de folhosa (TABELA 4). Paralelamente, a análise por ^{31}P RMN permitiu evidenciar o sucesso obtido na reação de acetilação. Tal observação foi constatada pelo desaparecimento de sinais específicos das hidroxilas aromáticas e de grande parte do sinal correspondente a hidroxilas alifáticas, assim como o aumento do sinal de hidroxilas de grupos carboxila, conforme demonstram os dados da FIGURA 16. No entanto, os valores obtidos por integração dos sinais podem ser superestimados devido ao padrão interno utilizado, como demonstrou Constant et al. (2016). Esses autores obtiveram quantidades de hidroxila superiores para as análises realizadas com ciclohexanol em comparação com análises utilizando colesterol como padrão interno.

TABELA 4 – IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HIDROXILAS DA LIGNINA FOSFITILADA VIA ^{31}P RMN.

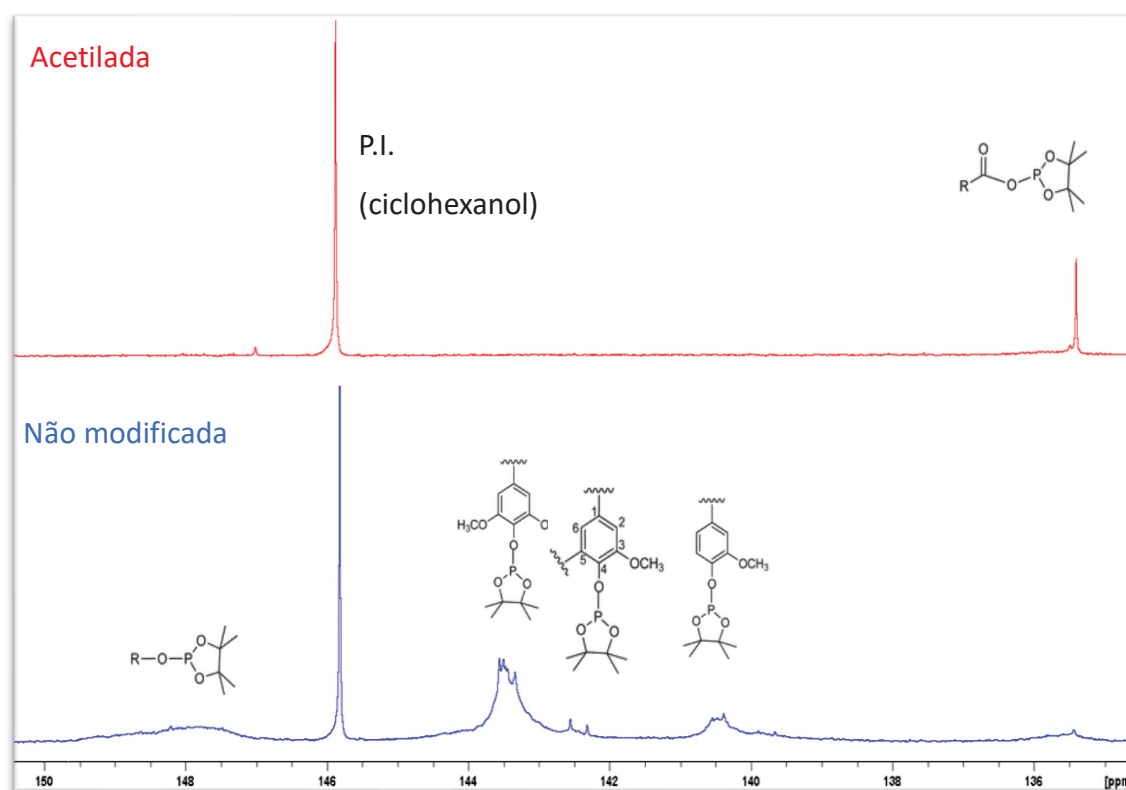
Origem das hidroxilas	δ (ppm)	Quantificação (mmol g ⁻¹)	
		Esse trabalho	Ahvazi et al. (2016)
Alifática	147-150	1,29	1,70
Siringila/Unidades condensadas	142-145	2,80	2,58
Guaiacila	139-141	0,99	0,85
Ácidos carboxílicos	135-137	0,35	0,34
OH Total		5,43	5,53*
Razão OH Fenólica/Alifática		2,95	1,87

* Valor obtido pelo autor para hidroxila correspondente a *p*-hidroxifenila = 0,06 mmol g⁻¹

FONTES: A autora (2020); Ahvazi et al. (2016)

FIGURA 16 – ESPECTRO ^{31}P RMN DA LIGNINA ACETILADA E NÃO MODIFICADA EM

PIRIDINA E CLOROFÓRMIO DEUTERADO (1,6:1).



FONTE: A autora (2020)

A identificação de unidades condensadas e unidades siringila na mesma área de integração seguiu as recomendação de Balakshin e Capanema (2015). Isso ocorre devido à sobreposição de unidades de siringila e possíveis unidades de guaiacila que sofreram condensação durante o processamento de folhosas, sendo que coníferas, por possuírem apenas unidades guaiacila, possibilitam assumir que as unidades condensadas têm todas a mesma origem. Embora a metodologia de fosfitilação da lignina e análise por RMN ^{31}P seja considerada referência, a limitação supracitada leva à utilização dessa técnica apenas para a quantificação indireta de hidroxilas e deixa a caracterização de outros grupos para outras técnicas de RMN, como a análise por RMN 2D. A presença do sinal referente a unidades condensadas indica que o processo, de fato, gerou condensação entre unidades fenilpropanoides e a razão $\text{OH}_{\text{fenólicas}}/\text{OH}_{\text{alifáticas}}$ elevada sugere clivagem extensiva de ligações aril-éter, parâmetro importante para revelar a reatividade química e as propriedades físicas da lignina como, por exemplo, o seu potencial antioxidante (CONSTANT et al., 2016; FERNÁNDEZ-COSTAS et al., 2014; PONOMARENKO et al., 2014).

O mapa de correlação ^1H - ^{13}C e os respectivos grupos identificados estão apresentados na FIGURA 18 (região aromática) e na FIGURA 18 (região alifática oxigenada), enquanto que as atribuições e dados de quantificação relativa encontram-se na TABELA 5. A identificação e interpretação dos deslocamentos químicos foram feitas por comparação com dados espectrais disponíveis na literatura especializada (CONSTANT et al., 2016; CRESTINI et al., 2017; FERNÁNDEZ-COSTAS et al., 2014; RENCORET et al. 2009; DEL RÍO et al., 2012; SETTE et al., 2011).

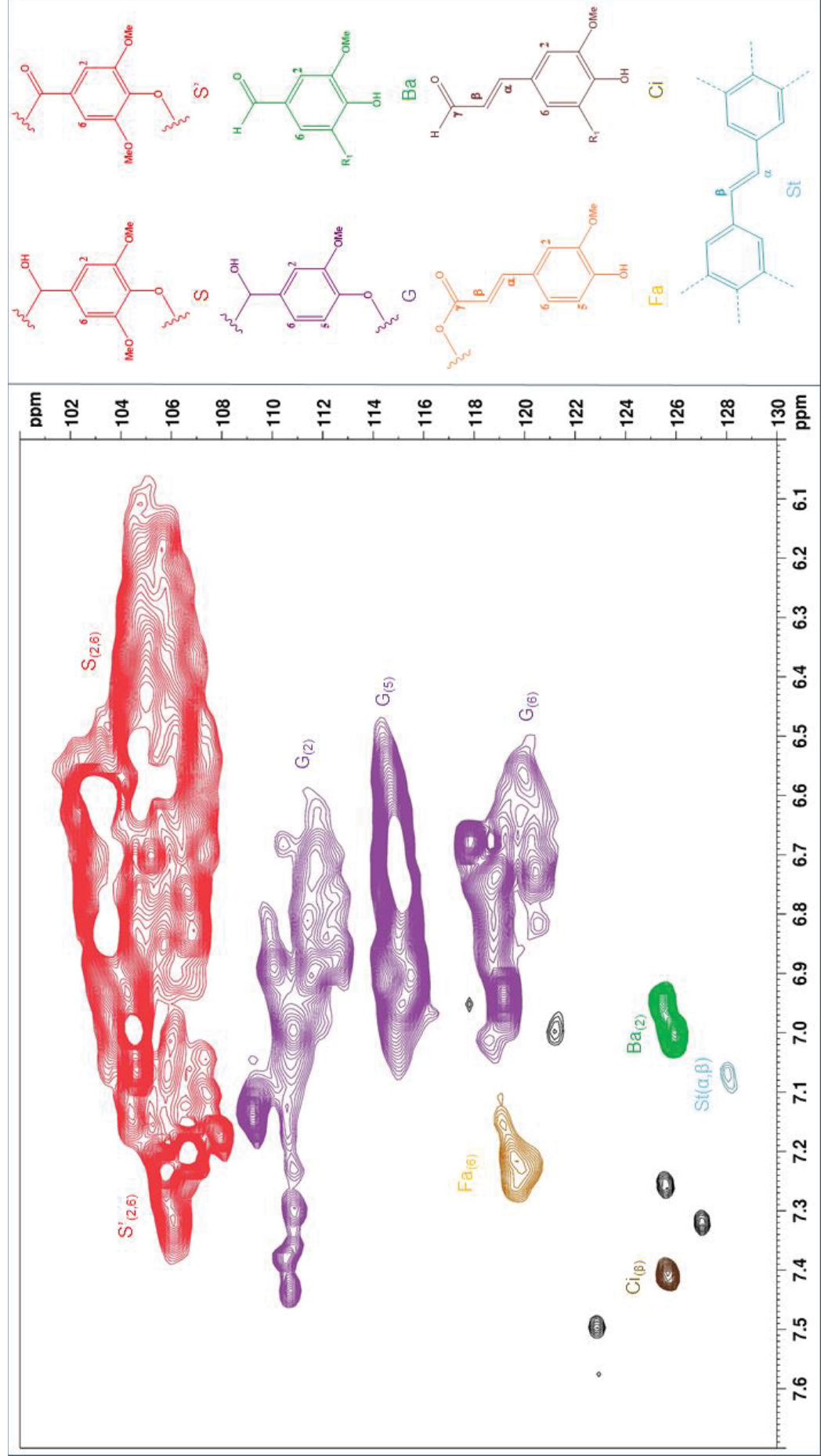
TABELA 5 – ATRIBUIÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (Δ) DAS CORRELAÇÕES RMN 2D ^1H - ^{13}C HSQC DA LIGNINA NÃO MODIFICADA EM DMSO- D_6 E QUANTIFICAÇÃO RELATIVA EM ABUNDÂNCIA A CADA 100 ANÉIS AROMÁTICOS.

Sigla	Grupo	H (δ)	C (δ)	Abundância / 100 Ar
G (2)	Guaiacila	6,87	111,3	18,62
S (2,6)	Siringila	6,60	104,7	70,18
S' (2,6)	Siringila oxidada	7,23	106,8	11,20
OMe	Metoxila	3,65	55,7	205,90
Fa (6)	Ferulato	7,23	119,7	2,06
Ci (β)	Aldeído cinâmico	7,41	125,8	0,74
X (2)	Xilose	3,05	72,3	
X (3)		3,27	73,6	3,53*
X (4)		3,51	75,3	
Be (α)	α -Benzil éter (lignina-carboidrato)	4,76	80,9	1,46
Aa (α)	Ácido guaiacil hidróxi-acético	4,44	73,6	0,83
Ba (2)	Benzaldeído	6,98	125,7	1,85
St (α,β)	Estilbeno	7,08	128,1	0,33
	Razão S:G			4,37
Sigla	Tipos de ligação (HSQC)	H (δ)	C (δ)	Abundância / 100 Ar
A (α)	β -O-4'	4,87	71,4	6,25
R (α)	β - β' resinol	4,63	85,0	4,99
F (α)	β -5' fenilcumarana	2,83	53,6	1,53

* O valor relativo da xilose foi calculado a partir da média das integrais das correlações dos sinais dos hidrogênios dos carbonos 2, 3 e 4.

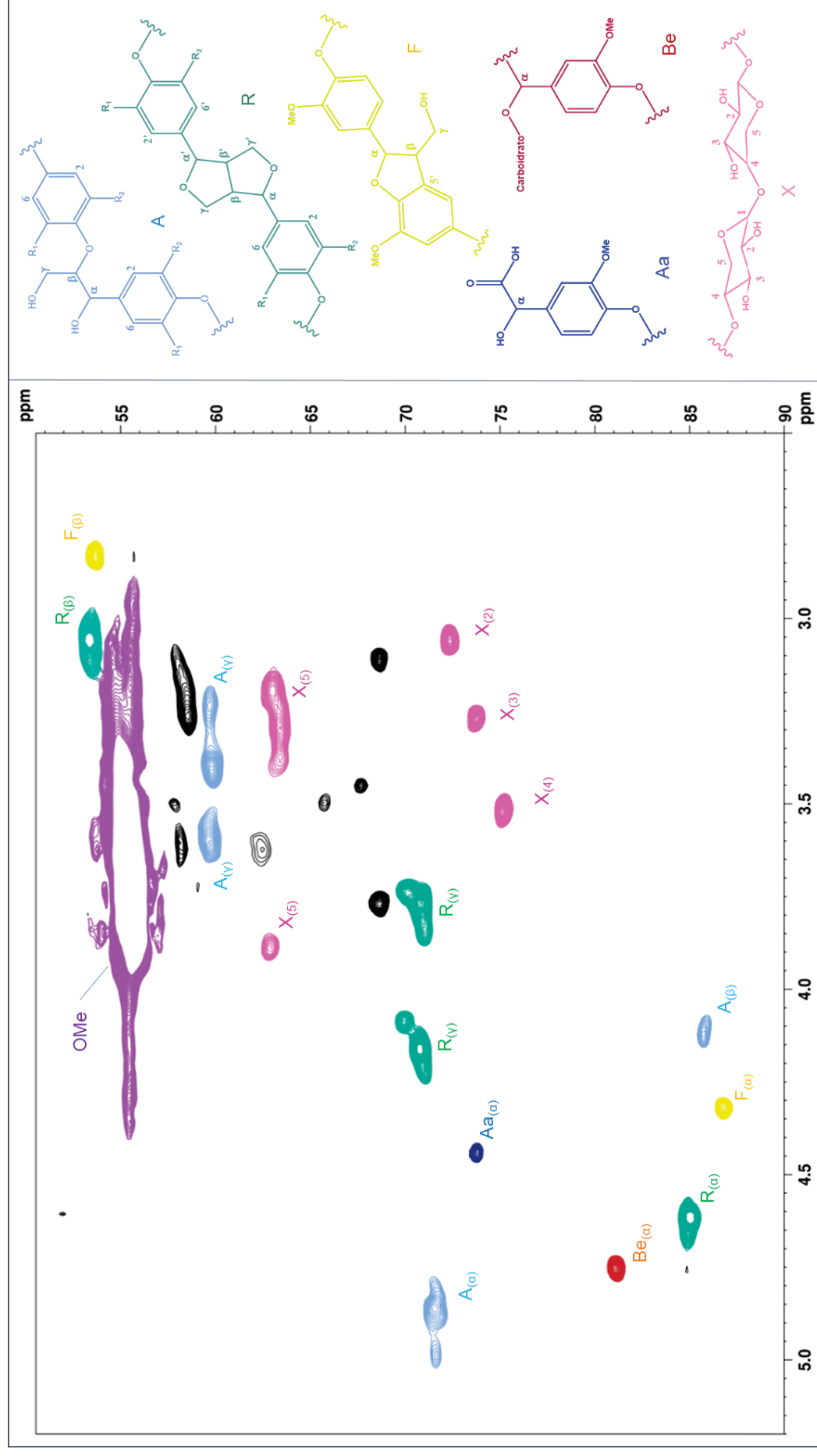
FONTE: A autora (2020)

FIGURA 17 – MAPA DE CORRELAÇÃO DE RMN 2D HSQC ^1H - ^{13}C EM DMSO DEUTERADO DA REGIÃO AROMÁTICA COM IDENTIFICAÇÃO DE ESTRUTURAS RELATIVAS AOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS.



Fonte: A autora (2020)

FIGURA 18 – MAPA DE CORRELAÇÃO DE RMN 2D HSQC ^1H - ^{13}C EM DMSO DEUTERADO DA REGIÃO ALIFÁTICA OXIGENADA COM IDENTIFICAÇÃO DE ESTRUTURAS RELATIVAS AOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS.



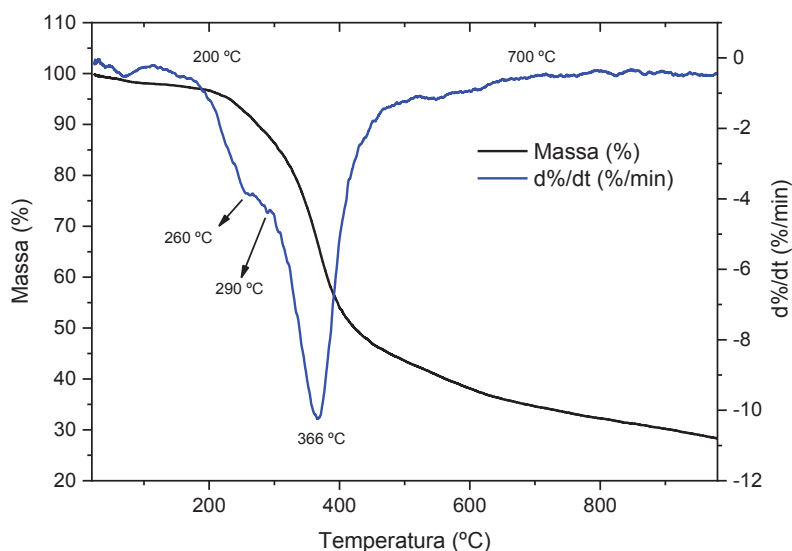
Fonte: A autora (2020)

O valor elevado obtido para o teor de grupos metoxila, de aproximadamente 2 unidades por anel aromático, é reconhecidamente superestimado devido à sobreposição com outros sinais, embora sirva como referencial característico de uma lignina derivada de folhosa onde há abundância de unidades sirigila. A razão S:G elevada também é condizente com a origem do material e com as reações de condensação inerentes ao processo; por exemplo, razões de 5,6 e 5,2 também foram obtidas por Fernández-Costas et al. (2014) para a lignina *kraft* de *E. globulus*. As correlações bidimensionais fornecem uma visão geral da amostra e embora não apresentem valores precisos para quantificação de grupos funcionais, auxiliam na compreensão da reatividade do material devido à redução drástica de ligações aril-éter (β -0-4'), que correspondem a aproximadamente 60% das ligações presentes na lignina nativa, à presença de ligações β - β' e β -5' devidas ao processo de deslignificação e à ocorrência de complexos lignina-carboidrato, identificados mediante a caracterização de ligações do tipo α -benzil éter. Vale ressaltar que a extensa clivagem dessas ligações é condizente com os resultados de baixa massa molar aparente identificadas por GPC. Finalmente, a presença de xilanas, já identificadas pela análise por CG-EM de acetatos de alditol, também foi confirmada no mapa de correlação.

A análise termogravimétrica (TGA) revela a degradação térmica da lignina, que apresenta perdas de massa em função do aumento gradativo da temperatura. Derivando o percentual de massa em função do tempo (DTG), é possível obter a taxa de perda de massa e a temperatura de maior perda de massa (DTG_{máx}), que são utilizadas como índice para comparar a estabilidade térmica de diferentes materiais. A FIGURA 19 demonstra que a DTG_{máx} da lignina técnica não modificada é de 366 °C, com taxa de perda de massa de 10% °C⁻¹ (m m⁻¹). Até 200 °C, considerada a temperatura de início da degradação térmica, a perda de massa é atribuída à umidade e demais impurezas de baixa massa molar (ALONSO et al., 2007). Entre 230 e 260 °C, ocorre a degradação das cadeias propanoides ligadas aos anéis aromáticos, formando derivados metílicos, etílicos e vinílicos de guaiacol (WITTKOWSKI et al., 1992). Os eventos ocorridos até 310 °C são atribuídos à clivagem de ligações aril-éter (VAZ, 2016) e, acima de 500 °C, a degradação é associada à decomposição de anéis aromáticos (TEJADO et al, 2007). Devido à complexidade estrutural da lignina, a faixa de degradação térmica se estende até aproximadamente 700 °C. Finalmente, obtém-se um resíduo carbonoso (carvão)

que é estável até 1000 °C e esse foi de 27,9% em massa para a amostra de lignina em questão.

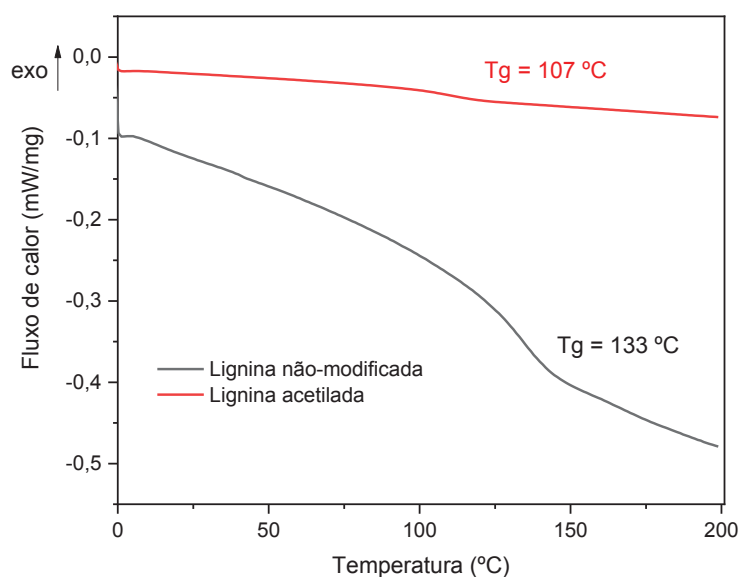
FIGURA 19 – ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA LIGNINA NÃO MODIFICADA (FLUXO DE 40 mL·min⁻¹ DE N₂ E TAXA DE AQUECIMENTO DE 20 °C·min⁻¹ DE 24 ATÉ 1000 °C)



FONTE: A autora (2020)

O comportamento térmico da lignina pode ser relacionado à flexibilidade de suas cadeias poliméricas, ao grau de entrecruzamento (*crosslinking*), ao teor de impurezas inorgânicas (cinzas) e à sua origem e composição, assim como ao histórico térmico do tratamento ao qual a lignina foi submetida (KUBO; KADLA, 2004). A temperatura de transição vítrea (T_g) é a temperatura abaixo da qual polímeros amorfos viscoelásticos se apresentam duros e vítreos e acima da qual apresentam a elasticidade resultante do entrelaçamento das cadeias, caracterizando-a como um fenômeno reversível. Normalmente, a obtenção da temperatura de transição vítrea (T_g) de um material heterogêneo é dificultada. O regime de aquecimento e resfriamento sugerido por Sammons et al. (2013) foi adotado com sucesso e as temperaturas de transição vítrea da lignina não modificada e acetilada foram medidas. Utilizando a DSC, o primeiro aquecimento foi desconsiderado para essa medida, sendo utilizado para a retirada de água, eventuais impurezas e solventes retidos; portanto, a T_g foi medida no segundo processo de aquecimento e a curva relativa a essa análise é apresentada na FIGURA 20.

FIGURA 20 – CURVA DE AQUECIMENTO DE DSC DAS LIGNINAS NÃO-MODIFICADA E ACETILADA (FLUXO DE 40 mL·min⁻¹ DE N₂ E TAXA DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO DE 10 °C·min⁻¹ NA FAIXA DE TEMPERATURA DE 0 A 200 °C).



Fonte: A autora (2020)

A Tg medida para a lignina não modificada foi de 133 °C e a mesma lignina acetilada apresentou um valor de 107 °C. A redução de Tg é condizente com a acetilação, resultante da quantidade de hidroxilas disponíveis para associação intermolecular. Em relação à lignina acetilada, sua substituição por grupos acetila, por serem pouco reativos e mais volumosos, facilitam o afastamento ou o distanciamento entre as cadeias poliméricas que resultam na diminuição dos valores de Tg (DOHERTY et al., 2011).

6.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA

6.2.1 Nanoprecipitação em antissolvente: troca de solvente por diálise

Utilizando a metodologia proposta por Lievonen et al. (2016) para uma análise preliminar da formação de nanopartículas a partir da lignina industrial, a lignina não modificada foi solubilizada em THF em quatro concentrações diferentes: 0,2; 1,0; 2,0 e 5,0 mg mL⁻¹. A concentração de 5,0 mg mL⁻¹ foi descartada devido à formação de aglomerados, observados macroscopicamente. As demais concentrações, em volume de 10 mL cada, foram filtradas, inseridas em membranas de diálise e submetidas a agitação magnética constante em béqueres

de 500 mL contendo água destilada por 24 h, com troca frequente da água. Após 24 h, as amostras foram coletadas e diluídas em água (1:100 v/v) para análise de seu diâmetro hidrodinâmico, através da técnica de DLS.

A amostra com a menor concentração de lignina pré-diálise ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) não apresentou correlação na análise de DLS, mesmo quando menos diluída, indicando que a concentração não foi suficiente para formação das nanopartículas. De acordo com o mecanismo de formação por nucleação e crescimento, o tamanho das nanopartículas deve aumentar proporcionalmente à concentração de lignina (FRANGVILLE et al., 2012; LIEVONEN et al., 2016).

Embora Lievonen et al. (2016) tenham encontrado a concentração mínima para a formação de nanopartículas de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, Frangville et al. (2012) encontraram uma concentração mínima de 1,5 % (m m^{-1}) para formação de nanopartículas de 200 nm, mantendo esse diâmetro até 4 %, concentração acima da qual as partículas apresentaram diâmetros abaixo de 100 nm. Utilizando a lignina não-modificada nesse trabalho, os diâmetros hidrodinâmicos aparentes, assim denominados por terem sido medidos apenas em um ângulo de observação, estão apresentados na TABELA 6 para concentrações de lignina de 1,0 e $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

A metodologia de diálise é uma alternativa simples para a produção de nanopartículas, no entanto, o volume excessivo de água utilizada, o longo tempo de diálise e a inutilização das membranas após o uso levaram à busca de outra metodologia de síntese. Também foi observado que os tamanhos médios das partículas, obtidas a partir de concentrações diferentes, não apresentaram diferenças significativas. Com o objetivo de produzir partículas com tamanho ajustável, a nanoprecipitação por troca de solvente por gotejamento foi explorada.

TABELA 6 – DIÂMETROS HIDRODINÂMICOS APARENTES DAS NANOPARTÍCULAS PRODUZIDAS VIA DIÁLISE MEDIDOS POR DLS 90°.

Medida	Diâmetro hidrodinâmico aparente (nm)	
	$1,0 \text{ mg mL}^{-1}$	$2,0 \text{ mg mL}^{-1}$
Medida 1	485,2	579,9
Medida 2	573,9	441,4
Média	529,6	510,7
Desvio padrão	44,4	69,3

Fonte: A autora (2020)

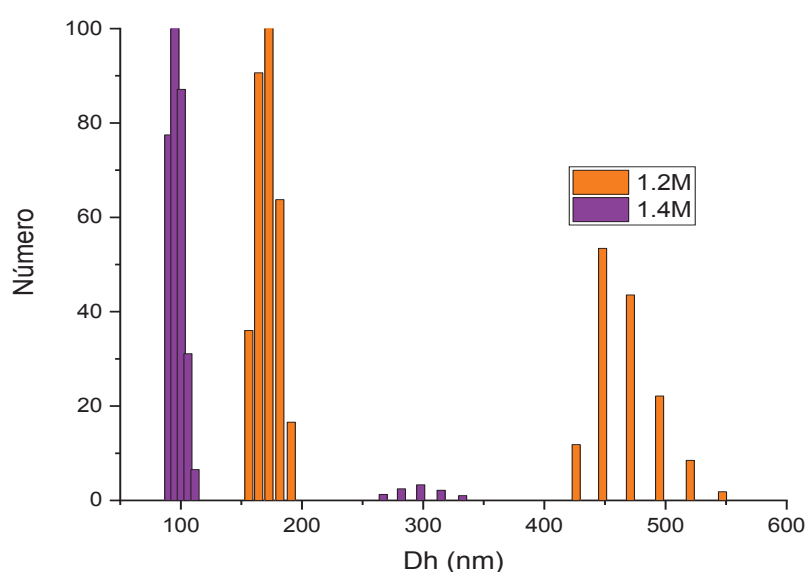
6.2.2 Nanoprecipitação em antissolvente por gotejamento

Em testes preliminares, foi observada a formação de agregados macroscópicos quando aplicada a metodologia de nanoprecipitação inversa, com adição de antissolvente (água ultrapurificada) sobre solução em THF. Por esse motivo, a metodologia adotada foi o gotejamento de solvente orgânico com lignina em antissolvente, o que resultou na dispersão de nanopartículas no meio.

As nanopartículas produzidas por gotejamento foram sintetizadas em triplicata, em datas diferentes, com identificação 1.2M e 1.4M, sendo 1 a concentração de lignina pré-gotejamento em mg mL^{-1} , 2 e 4 as velocidades de gotejamento em mL min^{-1} , e M a velocidade de agitação magnética aplicada no solvente, nesse caso, a velocidade máxima passível de ser atingida no agitador magnético. Velocidades de agitação menores foram testadas, porém, com formação visivelmente excessiva de aglomerados.

Os diâmetros hidrodinâmicos aparentes (D_h) das partículas foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e esses apresentaram uma distribuição bimodal, como ilustrado na FIGURA 21. Observa-se que as partículas produzidas com maior velocidade de gotejamento apresentaram populações com diâmetros menores. Adicionalmente, a maior velocidade de gotejamento reduziu consideravelmente a quantidade da população de partículas de maior D_h .

FIGURA 21 – DISTRIBUIÇÃO BIMODAL DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE DE LNPs ANALISADAS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO A 90°



FONTE: A autora (2020)

A análise da distribuição de tamanhos de uma corrida para cada amostra não é suficiente para determinar o diâmetro médio e se de fato há diferença estatística de diâmetros para velocidades de gotejamento diferentes. Para tanto, nove análises em triplicata foram realizadas para cada amostra usando o DLS e essas foram avaliadas no primeiro dia após a síntese (1D), após 15 dias (15D) e acima de 45 dias (>45D na TABELA 7) de armazenamento. Somente a população de menores diâmetros foi considerada para essa análise devido à limitação do equipamento em medir com precisão aglomerados micrométricos. As médias e desvios padrões calculados para as triplicatas em tempos diferentes de armazenamento encontram-se apresentadas na TABELA 7. A análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$) e o teste Tukey *post hoc* ($p < 0,001$) demonstraram não haver diferença significativa entre os diâmetros hidrodinâmicos médios aparentes das duas amostras de tempos diferentes, indicando a estabilidade coloidal do sistema dentro do prazo de análise avaliado. A distribuição de tamanhos bimodal aqui apresentada indica que, de acordo com o efeito Ouzo, as frações de soluto, solvente e antissolvente levaram a condições fora da região Ouzo, onde nanopartículas com faixas estreitas e unimodais de distribuição de tamanhos são produzidas (AUBRY et al., 2009). Outra possibilidade é a geração de núcleos grandes e pequenos no mecanismo de formação das nanopartículas, devido à elevada dispersão de massa molar.

TABELA 7 – DIÂMETROS HIDRODINÂMICOS APARENTES MÉDIOS DAS AMOSTRAS PRODUZIDAS EM TRIPLICATA COM IDADES DE 1, 15 E >45D

LNPs	Dh 1D (nm)		Dh 15D (nm)		Dh >45D (nm)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
1.2M	105,6	43,9	86,6	6,2	99,4	21,6
1.4M	75,6	10,1	78,0	15,2	95,6*	30,9

*Somente duas amostras da triplicata foram utilizadas para esse cálculo

FONTE: A autora (2020)

A estabilidade coloidal da dispersão de nanopartículas foi então avaliada pelo potencial Zeta, pontualmente e em diferentes valores de pHs. O potencial Zeta é uma medida indireta da carga superficial das partículas e consequentemente de sua repulsão eletrostática, e sua magnitude pode ser utilizada para avaliação da estabilidade coloidal e tendência à aglomeração. Os valores pontuais medidos de

potencial Zeta em pH próximo de $6,9 \pm 1,0$ para as LNPs produzidas em triplicata estão apresentados na TABELA 8.

TABELA 8 – POTENCIAL ZETA (ζ) MEDIDO PARA AS LNPS PRODUZIDAS EM TRIPLICATA.

	LNPs	pH	Potencial ζ / mV
1	LLF 1.2M	6,6	-42,3
	LLF 1.4M	6,7	-43,1
2	LLF 1.2M	6,7	-49,1
	LLF 1.4M	7,2	-51,9
3	LLF 1.2M	7,9	-39,7
	LLF 1.4M	7,4	-38,3
Média	LLF 1.2M	7,1	-43,7
	LLF 1.4M	7,1	-44,4

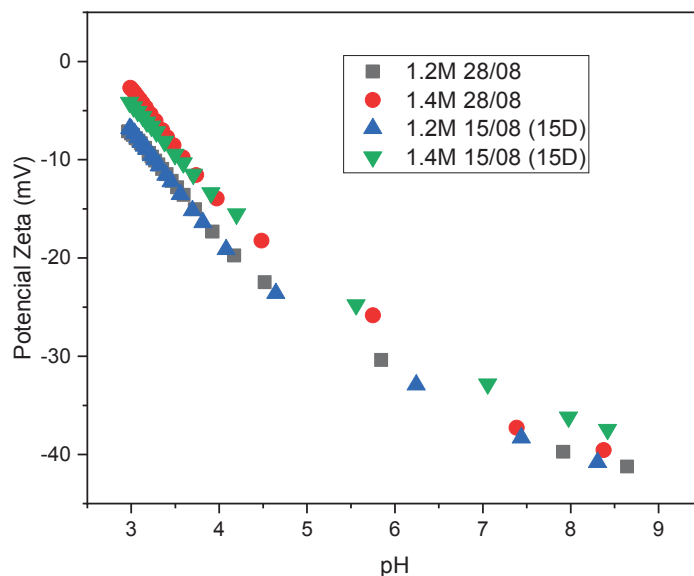
Fonte: A autora (2020)

Os valores obtidos indicam uma estabilidade coloidal moderada para o sistema. Valores reportados na literatura para nanopartículas de lignina variam entre -28 mV (CHEN et al., 2018), -40 mV (FRANGVILLE et al., 2012) e -60 mV (LIEVONEN et al., 2016). O potencial tipicamente negativo indica que a superfície das LNPs é carregada negativamente, provavelmente devido à presença de grupos hidroxila expostos ou orientados externamente (FRANGVILLE et al., 2012).

Pequenas mudanças de pH, conforme TABELA 8, afetaram o potencial Zeta. Assim, o potencial Zeta foi avaliado em função do pH nas duas amostras produzidas, com idades de 1 e 15 dias em dispersão (FIGURA 22). A titulação demonstra que as partículas se aproximam do ponto isoelétrico em pH abaixo de 3, com desestabilização do sistema devido à protonação de grupos expostos na superfície em pH abaixo de 4 (potencial Zeta < 30 mV). Com aumento do pH, houve um aumento do potencial Zeta para todas as amostras e pouca diferença foi observada entre perfis de amostras de idades diferentes. Nota-se também a estabilidade das nanopartículas em pH de 7 a 9, com potenciais Zeta próximos a 40 mV.

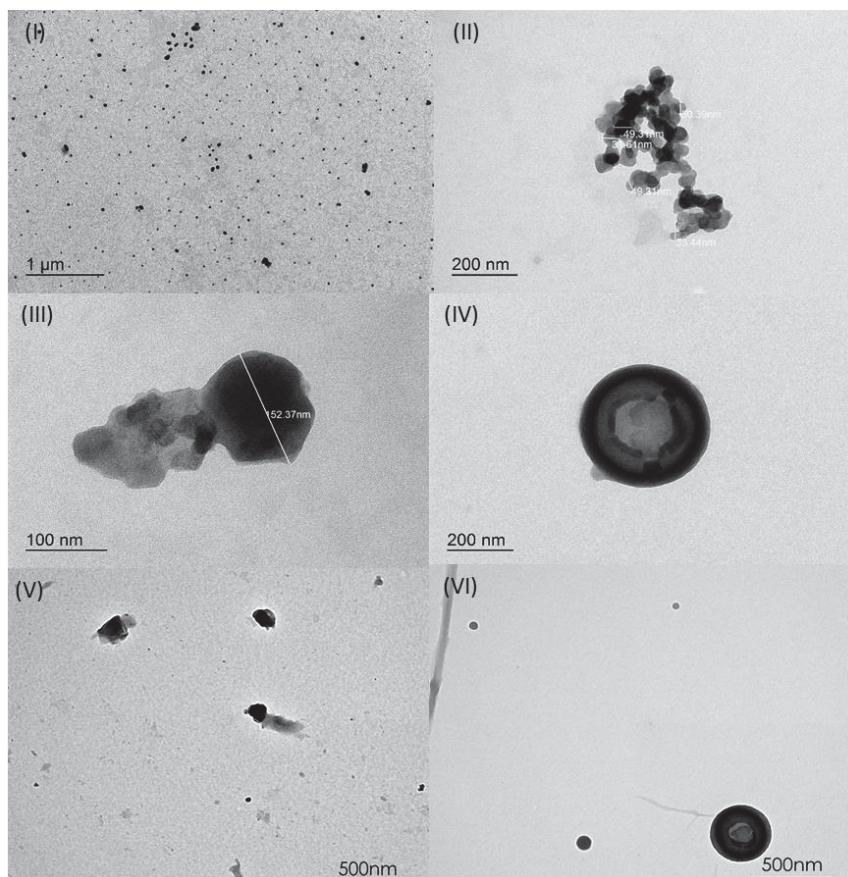
Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das LNP 1.2M e 1.4M são apresentadas nas FIGURAS 23 e 24, respectivamente. É possível observar a presença de duas populações distintas, com partículas em torno de 50 nm e acima de 100 nm, em concordância com os resultados de DLS.

FIGURA 22 – TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE LNP COM 1 E 15 DIAS EM DISPERSÃO EM SOLUÇÃO DE KCl 0,01 mol L⁻¹ EM ÁGUA ULTRAPURA, COM ADIÇÃO DE HCl 0,01 mol L⁻¹ ATÉ pH 3 E NaOH 0,01 mol L⁻¹ ATÉ pH 9.



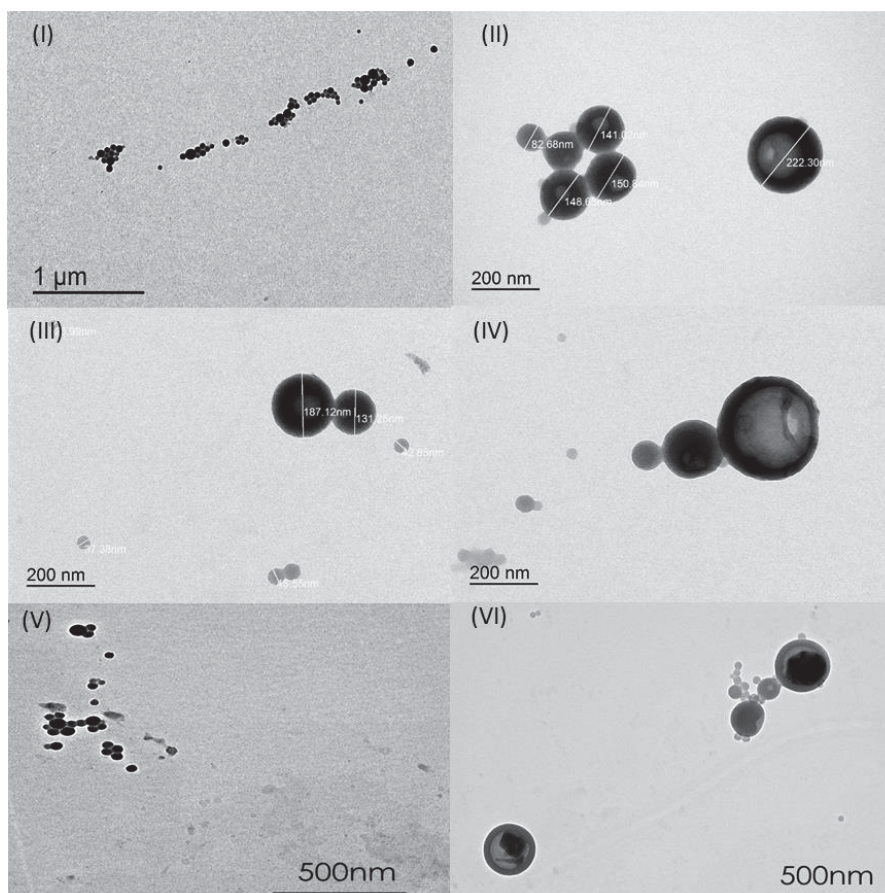
FONTE: A autora (2020)

FIGURA 23 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DA AMOSTRA 1.2M DE LNPS, APÓS 15 (I, II, III e IV) E 33 DIAS (V SEM SONICAÇÃO E VI SONICADA) EM DISPERSÃO.



Fonte: A autora (2020)

FIGURA 24 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DA AMOSTRA 1.4M DE LNPS, APÓS 15 (I, II, III e IV) E 33 DIAS (V e VI) EM DISPERSÃO



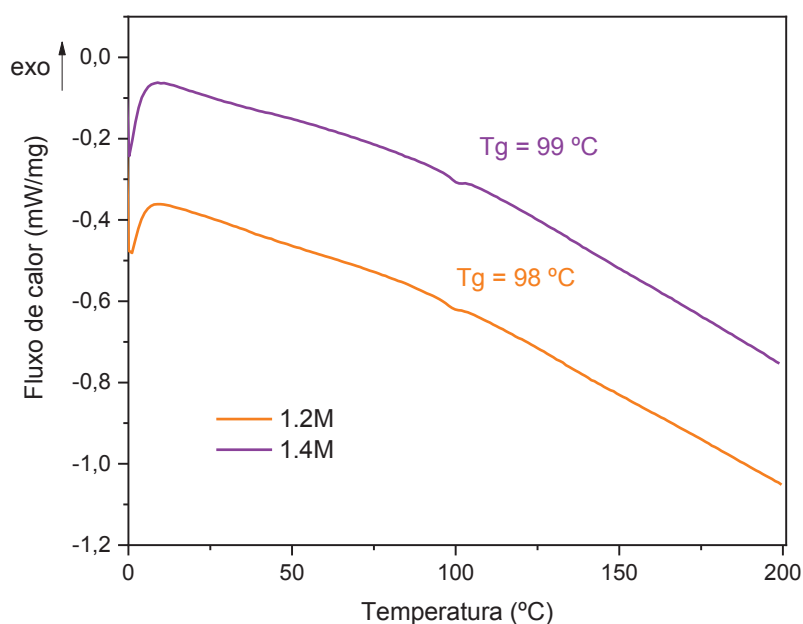
Fonte: A autora (2020)

A LNP 1.2M mostrou-se menos uniforme, com a presença de aglomerados disformes em 33 dias em suspensão. Após sonicação, mais partículas apresentam formato esférico, indicando que a estabilidade coloidal, governada pela cinética, leva à floculação com o passar do tempo e essa é reversível com a aplicação de energia para dispersão das partículas (COSGROVE, 2009). As amostras analisadas de LNP 1.4M não apresentaram diferença com sonicação, mesmo com presença de duas distribuições de tamanho.

Também foi possível observar a presença de partículas sólidas e ocas. As partículas ocas apresentaram diâmetros notavelmente maiores, com indícios de poros em alguns casos, que podem ter sido formados na operação de retirada de solvente aprisionado no interior da partícula, como relatado por Li et al. (2016).

A temperatura de transição vítrea (T_g) das LNPs foi avaliada seguindo a mesma metodologia aplicada para a lignina não-modificada e acetilada, cuja curva de fluxo de calor encontra-se apresentada na FIGURA 25.

FIGURA 25 – CURVA DE AQUECIMENTO DE DSC DAS LNPS 1.2M E 1.4M (FLUXO DE 40 mL min⁻¹ DE N₂, TAXA DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO DE 10 °C min⁻¹, EM FAIXA DE TEMPERATURA DE 0 A 200 °C).



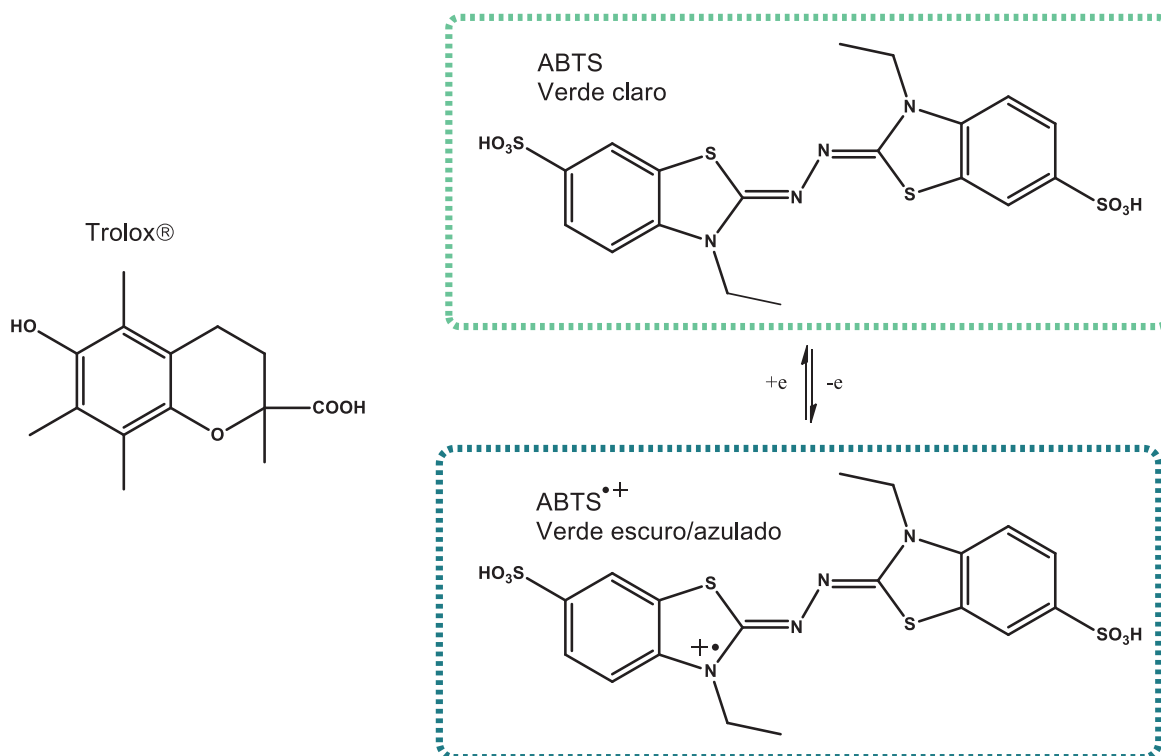
FONTE: A autora (2020)

A T_g medida para as amostras de LNPs foi de 98 °C para a amostra 1.2M e de 99 °C para a amostra 1.4M. Não foi encontrada na literatura análise semelhante para lignina nanoparticulada, no entanto, pode-se estabelecer uma hipótese baseada na possível orientação de grupos funcionais expostos na superfície das LNPs e no aumento de sua área superficial, resultando na redução da T_g na ausência de funcionalização química da lignina. Cui et al. (2013) demonstraram que a funcionalização de hidroxilas fenólicas, mesmo levando ao aumento do impedimento estérico causado pelo volume do grupo adicionado, resulta no aumento da estabilidade térmica do material, indicado pelo aumento nos valores de T_g .

6.2.3 Atividade antioxidante das nanopartículas

A atividade antioxidante das nanopartículas foi comparada ao análogo da Vitamina E solúvel em meio aquoso denominado Trolox® em ensaio de captura de radical ABTS^{•+} (FIGURA 26) em solução tampão fosfato salino (PBS) em pH 7,4.

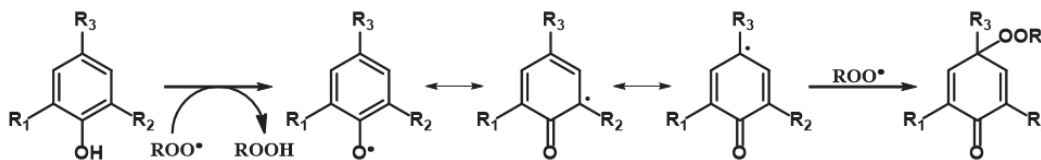
FIGURA 26 – ESTRUTURAS DO TROLOX®, ABTS [2,2'-AZINO-BIS (3-ETILBENZOTIAZOLIN) 6-ÁCIDO SULFÔNICO] E RADICAL ABTS^{•+}.



FONTE: A autora (2020)

Nesse estudo, não foi possível determinar o potencial antioxidante da lignina precursora nas mesmas condições do ensaio realizado com as LNPs, devido a sua baixa solubilidade na solução tampão. Alguns autores compararam as atividades antioxidantes de ligninas nanoparticuladas e de seus materiais precursores, empregando ensaios como o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Foi demonstrado que os materiais nanoparticulados apresentam atividade antioxidante aumentada devido a sua elevada razão área/volume e superfície rica em grupos hidroxila fenólicos (GE et al., 2014; LU et al., 2012). O mecanismo de ação antioxidante de uma unidade de lignina na superfície da nanopartícula é ilustrado na FIGURA 27.

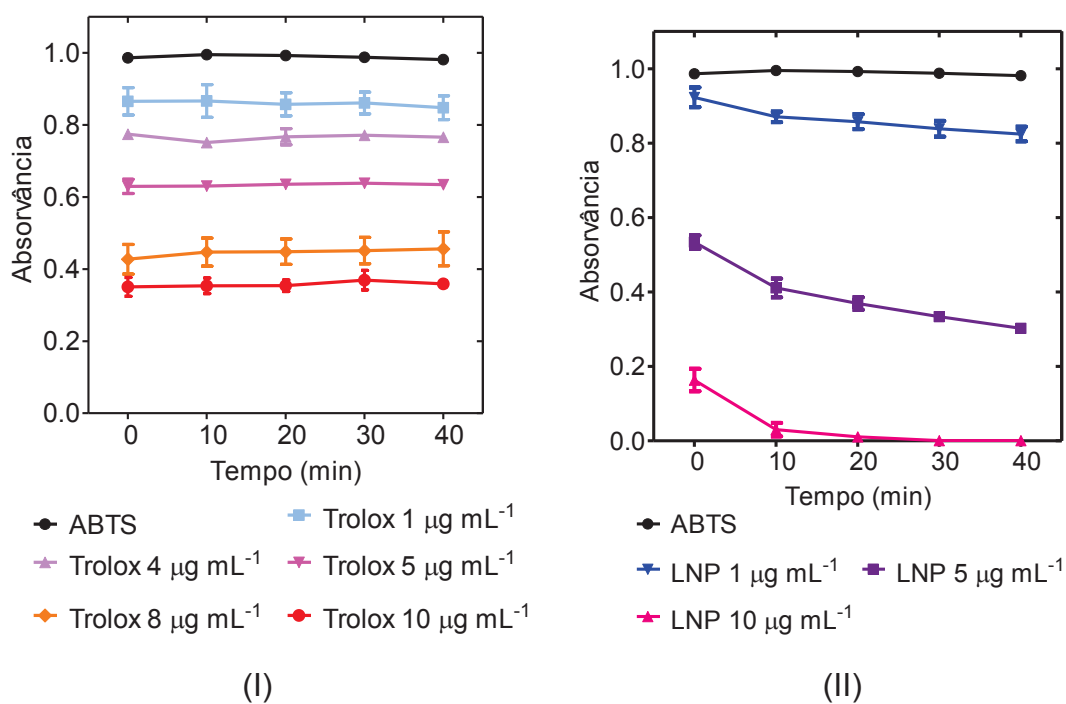
FIGURA 27 – MECANISMO DA AÇÃO ANTIOXIDANTE E ENVOLVENDO CAPTURA DE CAPTURA DE RADICAL, QUE OCORRE HIPOTETICAMENTE NA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS



FONTE: A autora (2020)

As nanopartículas selecionadas para essa análise foram as de menor diâmetro (LNP 1.4M). Enquanto o Trolox® alcançou seu máximo de inibição praticamente no tempo inicial em todas as concentrações utilizadas nesse ensaio, as LNPs continuaram a exercer ação inibitória sobre o radical ao longo de todo o tempo, sendo que na maior concentração ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) houve estabilização a partir de 30 min, notada pelo comportamento da absorvância na FIGURA 28.

FIGURA 28 – ABSORVÂNCIA DO RADICAL ABTS^{••} MEDIDA EM 734 NM (SOLUÇÃO TAMPÃO PBS pH 7,4) EM FUNÇÃO DO TEMPO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TROLOX® (I) E DE LNP 1.4M (II).



FONTE: A autora (2020)

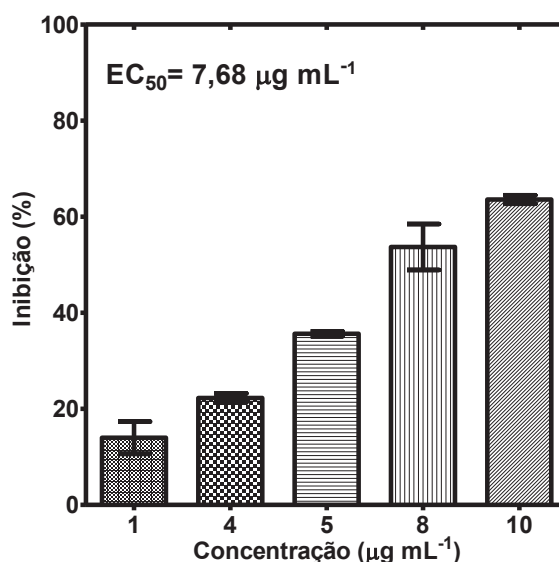
O percentual de inibição foi calculado para todos os tempos a partir desses valores em relação à da curva padrão de Trolox®. A concentração efetiva para 50% de inibição (EC_{50}) e o equivalente de Trolox® (TEAC) foram calculados para cada tempo e esses se encontram apresentados na TABELA 9. As FIGURA 29 e 30 mostram os perfis de inibição do padrão antioxidante e das LNPs em tempo igual a 40 min, respectivamente.

TABELA 9 – EC_{50} E TEAC CALCULADOS PARA PADRÃO ANTIOXIDANTE TROLOX® E LNPS

Amostra	Tempo (min)	EC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	TEAC
Trolox®	(média)	7,68	1
LNP 1.4M	0	5,89	1,30
	10	4,73	1,62
	20	4,47	1,72
	30	4,22	1,82
	40	4,04	1,90

Fonte: A autora (2020)

FIGURA 29 – INIBIÇÃO DO RADICAL $ABTS^{\bullet+}$ EM SOLUÇÃO TAMPÃO PBS pH 7,4 EMPREGANDO O ANTIOXIDANTE PADRÃO TROLOX® POR UM TEMPO DE 40 min.

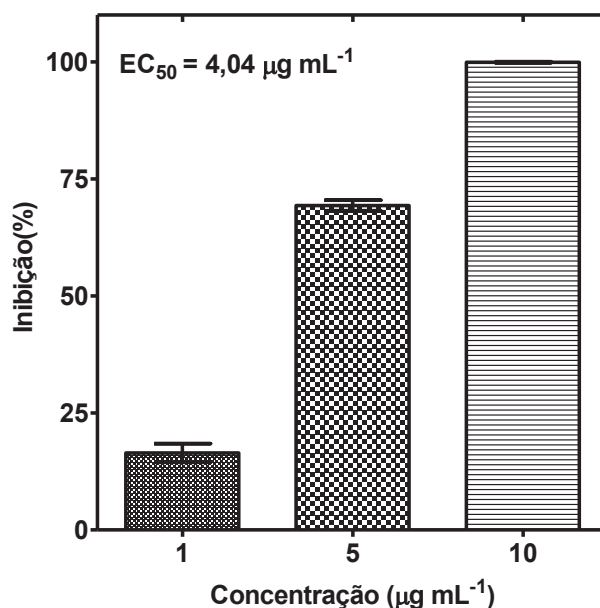


FONTE: A autora (2020)

Comparativamente, valores reduzidos de EC_{50} indicam que é necessária menor quantidade de antioxidantes para inibir 50% do radical $ABTS^{\bullet+}$. Observa-se que as LNPs alcançaram desempenho de EC_{50} superior ao do padrão antioxidante,

desde o início do ensaio. O máximo de inibição das LNPs também foi superior, especialmente comparando os valores de inibição obtidos para concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de 69,3% e 99,9%, respectivamente, contra 35,6% e 53,7% para as concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Trolox®.

FIGURA 30 – INIBIÇÃO DO RADICAL ABTS^{•+} (SOLUÇÃO TAMPÃO PBS pH 7,4) COM NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA (LNP 1.4M) EM TEMPO DE 40 min.



FONTE: A autora (2020)

Chandna et al. (2019) sintetizaram nanopartículas de lignina *kraft* e nanocomplexos de lignina *kraft* contendo prata e ouro (Au-Ag-LK) e mediram as suas propriedades antioxidantes nas mesmas condições experimentais, empregando tampão fosfato pH 7,4. Os percentuais de inibição do radical ABTS^{•+} por esses nanocomplexos em tempo de reação de 15 min estão apresentados na TABELA 10, em comparação com os resultados obtidos nesse trabalho para o tempo de reação de 10 min. Curiosamente, tendo em vista o maior diâmetro de partícula e consequentemente uma relação área/volume comparativamente menor, as LNPs apresentaram desempenho de inibição próximo aos nanocomplexos Au-Ag-LK, cujos valores foram de 96,8% e 96,3%, respectivamente. Apesar de inibição semelhante, em relação aos EC₅₀, os valores encontrados por Chandna et al. (2019) foram superiores aos obtidos para as LNPs (25,6 e 4,73 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), indicando maior atividade antioxidante das LNPs.

TABELA 10 – COMPARATIVO DE RESULTADOS DE ANÁLISE ANTIOXIDANTE ABTS DE NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA E NANOCOMPLEXOS DE LIGNINA, OURO E PRATA.

	Amostra	Tempo (min)	Diâmetro (nm)	EC50 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Inibição final (%)
Esse trabalho	LNP 1.4M	10	75,6	4,73	96,8
	Nanopartícula Lignina kraft (LK)		-	38,5	64,8
Chandna et al. (2019)	Nanocomplexo Au-LK	15	19,31	39,6	63,0
	Nanocomplexo Ag-LK		31,12	28,2	88,6
	Nanocomplexo Au-Ag-LK		36,08	25,6	96,3

Fonte: A autora (2020)

Salvo diferenças metodológicas, o desempenho antioxidante das nanopartículas não depende apenas da relação área/volume, mas também da estrutura química do material de partida. A estrutura da lignina precursora é, portanto, decisiva para a atividade antioxidante e sofre influência dos substituintes no anel aromático. Em estudo com moléculas modelo de lignina, Dizhbite et al. (2004), determinaram a influência de grupos metoxila: unidades siringila, que são dimetoxiladas, apresentam atividade antioxidante maior do que unidades guaiacila. Por outro lado, houve também a contribuição de estruturas α -carbonílicas como unidades siringila oxidadas, identificadas na análise de RMN 2D da lignina com abundância de 11,2 /100 anéis aromáticos. Já a conjugação envolvendo apenas carbonos na cadeia propanóide influencia positivamente a atividade antioxidante pelo efeito de estabilização do radical por conjugação. A análise química do material de origem, com elevado teor de hidroxilas fenólicas e abundância relativa de unidades siringila (embora parte da siringila identificada possa corresponder a unidades condensadas) for coerente com a observação de elevada atividade antioxidante nas nanopartículas.

7 CONCLUSÃO

Uma lignina *kraft* de eucalipto, isolada em uma planta piloto pelo processo de LignoBoost™, foi caracterizada para produção de nanopartículas por nanoprecipitação sem etapas prévias de purificação, utilizando tetraidrofurano como solvente e água ultrapurificada como antissolvente.

Uma metodologia de preparo de nanopartículas a partir desse material de partida foi estabelecida, resultando em partículas sólidas regularmente esféricas de tamanho ajustável pela velocidade de gotejamento do solvente em antissolvente, com eventual ocorrência de partículas ocas. As dispersões coloidais de nanopartículas de lignina em água apresentaram boa estabilidade em diluição, sem alterações significativas de tamanho em tempos superiores a 45 dias e pH próximo da neutralidade. A redução de temperatura de transição vítrea (T_g) das nanopartículas em relação ao material original, mesmo após acetilação para reduzir interação moleculares que pudessem resultar em fenômenos de aglomeração, pode ter sido resultante de alteração na área superficial e na distribuição de grupos funcionais expostos na superfície, alterando o efeito associativo de interações intermoleculares.

Os efeitos de exposição de grupos, especialmente hidroxilas, e o aumento da área superficial contribuem também para a expressiva atividade antioxidante observada para o material, avaliada pelo ensaio ABTS. Além disso, os teores elevados de hidroxila e elevada razão S:G, caracterizados na lignina precursora, são fatores que contribuem para que o material seja um antioxidante superior ao padrão Trolox®. As principais impurezas encontradas no material de origem foram carboidratos residuais. No entanto, sua presença não prejudicou a propriedade antioxidante do material, embora em etapas futuras a caracterização química das nanopartículas possa esclarecer se os carboidratos permanecem na estrutura após a nanoprecipitação.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

O procedimento aplicado para síntese de nanopartículas pode ser estendido para ligninas de outras fontes, como, por exemplo, ligninas de hidrólise enzimática ou isoladas pelo processo LignoForce™. A utilização de acetona no lugar do tetraidrofurano é uma alternativa a ser explorada na nanoprecipitação, tendo em vista sua menor toxicidade e a alta solubilidade em acetona da lignina LignoBoost™ avaliada nesse trabalho.

A presença de solvente residual da metodologia de nanoprecipitação é um parâmetro que deve ser avaliado, assim como a presença dos carboidratos residuais. Essa análise poderá ser realizada utilizando a mesma metodologia de RMN 2D aplicada para caracterização da lignina precursora.

Outras metodologias podem complementar a análise da atividade antioxidante das nanopartículas de lignina, especialmente métodos não-espectrofotométricos que não sofrem interferência da absorvância das nanopartículas como, por exemplo, ressonância paramagnética eletrônica (EPR-*Electronic Paramagnetic Resonance*).

Estudos preliminares não apresentados nesse documento sugerem a investigação da utilização das nanopartículas de lignina para estabilização de emulsões de Pickering (emulsões estabilizadas por partículas) em sistemas água-óleo e água-água. Pretende-se, assim, explorar as nanopartículas produzidas como um produto polifuncional: ação antioxidante, estabilizante e com propriedades de proteção à radiação UV.

9 REFERÊNCIAS

ABBATI DE ASSIS, C.; GRECA, L. G.; AGO, M.; et al. Techno-Economic Assessment, Scalability, and Applications of Aerosol Lignin Micro- and Nanoparticles. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 6, n. 9, p. 11853–11868, 2018.

ABDELAZIZ, O. Y.; HULTEBERG, C. P. Physicochemical Characterisation of Technical Lignins for Their Potential Valorisation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 3, p. 859–869, 2017.

AGO, M.; HUAN, S.; BORGHEI, M.; et al. High-throughput synthesis of lignin particles (~30 nm to ~2 µm) via aerosol flow reactor: Size fractionation and utilization in pickering emulsions. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 35, p. 23302–23310, 2016.

AHVAZI, B.; CLOUTIER, É.; WOJCIECHOWICZ, O.; NGO, T. D. Lignin Profiling: A Guide for Selecting Appropriate Lignins as Precursors in Biomaterials Development. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 10, p. 5090–5105, 2016.

ALONSO, M. V.; RODRÍGUEZ, F.; OLIET, M.; DOMÍNGUEZ, J. C.; GILARRANZ, M. A. Thermal stability and pyrolysis kinetics of organosolv lignins obtained from Eucalyptus globulus. **Industrial Crops and Products**, v. 27, n. 2, p. 150–156, 2007.

ARGYROPOULOS, D. S.; CRESTINI, C. A Perspective on Lignin Refining, Functionalization, and Utilization. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 10, p. 5089, 2016.

AUBRY, J.; GANACHAUD, F.; ADDAD, J. P. C.; CABANE, B. Nanoprecipitation of polymethylmethacrylate by solvent shifting: 1. Boundaries. **Langmuir**, v. 25, n. 4, p. 1970–1979, 2009.

AZADFAR, M.; GAO, A. H.; CHEN, S. Structural characterization of lignin: A potential source of antioxidants guaiacol and 4-vinylguaiacol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 58–66, 2015.

BAIKA, L. M.; SANTOS, E. J. D.; HERRMANN, A. B.; GRASSI, M. T. Simultaneous determination of As, Hg, Sb, and Se in mineral fertilizers using ultrasonic extraction and CVG-ICP OES. **Analytical Methods**, v. 8, n. 47, p. 8362–8367, 2016.

BALAKSHIN, M.; CAPANEMA, E. On the quantification of lignin hydroxyl groups with ³¹P and ¹³C NMR spectroscopy. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 35, n. 3, p. 220–237, 2015.

BARERAS-URBINA, C. G.; RAMÍREZ-WONG, B.; LÓPEZ-AHUMADA, G. A.; et al. Nano- and Micro-Particles by Nanoprecipitation: Possible Application in the Food and Agricultural Industries. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 9, p. 1912–1923, 2016.

BAUMBERGER, S.; ABAECHERLI, A.; FASCHING, M.; et al. Molar mass determination of lignins by size-exclusion chromatography: Towards standardisation of the method. **Holzforschung**, v. 61, n. 4, p. 459–468, 2007.

BECK-BROICHSITTER, M.; RYTTING, E.; LEBHARDT, T.; WANG, X.; KISSEL, T. Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the “ouzo region” upon drug loading. **European Journal of**

Pharmaceutical Sciences, v. 41, n. 2, p. 244-253, 2010.

BEISL, S.; LOIDOLT, P.; MILTNER, A.; HARASEK, M.; FRIEDL, A. Production of micro- and nanoscale lignin from wheat straw using different precipitation setups. **Molecules**, v. 23, n. 3, 2018.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 49, n. 2, p. 3–8, 2000.

BHUSHAN, B. **Springer Handbook of Nanotechnology**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2017.

BLAKENEY, A. B.; HARRIS, P. J.; HENRY, R. J.; STONE, B. A. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. **Carbohydrate Research**, v. 113, n. 2, p. 291–299, 1983.

BRÄNNVALL, E. The Limits of Delignification in Kraft Cooking. **BioResources**, v. 12, n. 1, p. 2081–2107, 2017.

BRODIN, I.; SJÖHOLM, E.; GELLERSTEDT, G. Kraft lignin as feedstock for chemical products: The effects of membrane filtration. **Holzforschung**, v. 63, n. 3, p. 290–297, 2009.

BYKOV, I. **Characterization of Natural and Technical Lignins using FTIR Spectroscopy**. 2008. 41 f. Dissertação (Master's in Chemical Engineering and Geosciences) - Lulea University of Technology, Lulea, Suécia. Disponível em: <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:1016107/FULLTEXT01.pdf>. Acesso em 20 ago. 2019.

CACHET, N.; CAMY, S.; BENJELLOUN-MLAYAH, B.; CONDORET, J. S.; DELMAS, M. Esterification of organosolv lignin under supercritical conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 287–297, 2014.

CHAKAR, F. S.; RAGAUSKAS, A. J. Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. **Industrial Crops and Products**, v. 20, n. 2, p. 131–141, 2004.

CHANDNA, S.; THAKUR, N. S.; REDDY, Y. N.; KAUR, R.; BHAUMIK, J. Engineering Lignin Stabilized Bimetallic Nanocomplexes: Structure, Mechanistic Elucidation, Antioxidant, and Antimicrobial Potential. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 5, n. 7, p. 3212–3227, 2019.

CHEN, L.; ZHOU, X.; SHI, Y.; et al. Green synthesis of lignin nanoparticle in aqueous hydrotropic solution toward broadening the window for its processing and application. **Chemical Engineering Journal**, v. 346, p. 217–225, 2018.

CONSTANT, S.; WIENK, H. L. J.; FRISSEN, A. E.; et al. New insights into the structure and composition of technical lignins: A comparative characterisation study. **Green Chemistry**, v. 18, n. 9, 2016.

COSGROVE, T. **Colloid Science: Principles, Methods and Applications**. Bristol: Wiley, 2009.

CRESTINI, C.; LANGE, H.; SETTE, M.; ARGYROPOULOS, D. S. On the structure of softwood kraft lignin. **Green Chemistry**, v. 19, n. 17, p. 4104–4121, 2017.

CRESTINI, C.; MELONE, F.; SETTE, M.; SALADINO, R. Milled wood lignin: A linear oligomer. **Biomacromolecules**, v.12, n. 11, p. 3928-3935, 2011.

CUI, C.; SADEGHIFAR, H.; SEN, S.; ARGYROPOULOS, D. S. Toward

thermoplastic lignin polymers; Part II: Thermal & polymer characteristics of kraft lignin & derivatives. **BioResources**, v. 8, n. 1, p. 864–886, 2013.

DHOTEL, A.; CHEN, Z.; DELBREILH, L.; et al. Molecular motions in functional self-assembled nanostructures. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 2303–2333, 2013.

DIZHBITE, T.; TELYSHEVA, G.; JURKJANE, V.; VIESTURS, U. Characterization of the radical scavenging activity of lignins - Natural antioxidants. **Bioresource Technology**, 2004.

DOHERTY, W. O. S.; MOUSAVIOUN, P.; FELLOWS, C. M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 2, p. 259–276, 2011.

DUVAL, A.; LAWOKO, M. A review on lignin-based polymeric, micro- and nano-structured materials. **Reactive and Functional Polymers**, v. 85, p. 78–96, 2014.

EUGENIA EUGENIO, M.; IBARRA, D.; MARTÍN-SAMPEDRO, R.; et al. Alternative Raw Materials for Pulp and Paper Production in the Concept of a Lignocellulosic Biorefinery. In: RODRÍGUEZ PASCUAL, A; EUGENIA EUGENIO, M. (Ed.). **Cellulose**, 2019.

EVSTIGNEYEV, E. I.; KALUGINA, A. V.; IVANOV, A. Y.; VASILYEV, A. V. Contents of α -O-4 and β -O-4 Bonds in Native Lignin and Isolated Lignin Preparations. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 37, n. 4, p. 294–306, 2017.

FAIX, B. O.; ARGYROPOULOS, D. S.; ROBERT, D.; NEIRINCK, V. Determination of hydroxyl groups in lignins evaluation of 1H - ^{13}C -, ^{31}P -NMR, FTIR and wet chemical methods. **Holzforschung**, v. 48, n. 5, p. 387–394, 1994.

FAROOQ, M.; ZOU, T.; RIVIERE, G.; SIPPONEN, M. H.; ÖSTERBERG, M. Strong, Ductile, and Waterproof Cellulose Nanofibril Composite Films with Colloidal Lignin Particles. **Biomacromolecules**, v. 20, n. 2, p. 693–704, 2019.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin e New York: De Gruyter, 1989.

FERNÁNDEZ-COSTAS, C.; GOUVEIA, S.; SANROMÁN, M. A.; MOLDES, D. Structural characterization of Kraft lignins from different spent cooking liquors by 1D and 2D Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. **Biomass and Bioenergy**, v. 63, p. 156–166, 2014.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FIGUEIREDO, P.; LINTINEN, K.; HIRVONEN, J. T.; KOSTIAINEN, M. A.; SANTOS, H. A. Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. **Progress in Materials Science**, v. 93, p. 233–269, 2018.

FIGUEIREDO, P.; LINTINEN, K.; KIRIAZIS, A.; et al. In vitro evaluation of biodegradable lignin-based nanoparticles for drug delivery and enhanced antiproliferation effect in cancer cells. **Biomaterials**, v. 121, p. 97-108, 2017.

FRANGVILLE, C.; RUTKEVIČIUS, M.; RICHTER, A. P.; et al. Fabrication

of environmentally biodegradable lignin nanoparticles. **ChemPhysChem**, v. 13, n. 18, p. 4235–4243, 2012.

FRANK, H. S.; EVANS, M. W. Free volume and entropy in condensed systems III. Entropy in binary liquid mixtures. **Journal of Chemical Physics**, 1945.

FREITAG, K. **Preparation of Nanodispersions By Antisolvent Precipitation**. 2010. 201 f. Tese (zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie) Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland. Disponível em: https://edoc.ub.uni-muenchen.de/17848/1/Freitag_Klaus.pdf. Acesso em 20 dez. 2019.

GANACHAUD, F.; KATZ, J. L. Nanoparticles and nanocapsules created using the ouzo effect: Spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices. **ChemPhysChem**, v. 6, n. 2, p. 209–216, 2005.

GE, Y.; WEI, Q.; LI, Z. Preparation and evaluation of the free radical scavenging activities of nanoscale lignin biomaterials. **BioResources**, v. 9, n. 4, p. 6699–6706, 2014.

GRANATA, A.; ARGYROPOULOS, D. S. 2-Chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholane, a Reagent for the Accurate Determination of the Uncondensed and Condensed Phenolic Moieties in Lignins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 6, p. 1538–1544, 1995.

GRZYBOWSKI, B. A.; GRANICK, S.; FITZNER, K.; PACZESNY. From dynamic self-assembly to networked chemical systems. **J. Chem Soc Rev**, v. 46, n. 18, p. 5647–5678, 2017.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, P.; BAQUERO, L. P.; LARROTA, H. R. Flavonoids: Potential Therapeutic Agents by Their Antioxidant Capacity. In: SEGURA-CAMPOS, M. R. (Ed.). **Bioactive Compounds**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2019. p. 265-288.

HUNTER, C. A.; SANDERS, J. K. M. The Nature of π - π Interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 14, p. 5525-5534, 1990.

HUSSEINI, G. A.; PITT, W. G. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 10, p. 1137-1152, 2008.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 25, p. 4497-4559, 2015.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology** (the “Gold Book”). Oxford: Blackwell Scientific Publications, 2014.

JOYE, I. J.; MCCLEMENTS, D. J. Production of nanoparticles by anti-solvent precipitation for use in food systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 34, n. 2, p. 109–123, 2013.

KAI, D.; TAN, M. J.; CHEE, P. L.; et al. Towards lignin-based functional materials in a sustainable world. **Green Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 1175–1200, 2016.

KOSHIJIMA, T.; WATANABE, T. Residual Lignin in Alkaline Pulps. In: KOSHIJIMA, T.; WATANABE, T. (Ed.). **Association Between Lignin and Carbohydrates in Wood and Other Plant Tissues**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2003. p. 131-215.

KRAEMER, E. O.; DEXTER, S. T. The Light-Scattering Capacity (Tyndall

Effect) and Colloidal Behavior of Gelatine Sols and Gels. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 31, n. 5, p. 764–782, 1927.

KUBO, S.; URAKI, Y.; SANO, Y. Thermomechanical analysis of isolated lignins. **Holzforschung**, v. 50, n. 2, p. 144–150, 1996.

LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Progress in Polymer Science Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 7, p. 1266–1290, 2014a.

LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 7, p. 1266–1290, 2014b.

LAWOKO, M.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Structural differences between the lignin-carbohydrate complexes present in wood and in chemical pulps. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 3467–3473, 2005.

LEE, Y. S. **Self-Assembly and Nanotechnology: A Force Balance Approach**. Bristol: Wiley, 2007.

LEPELTIER, E.; BOURGAUX, C.; COUVREUR, P. Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 21, p. 86-97, 2014.

LI, H.; DENG, Y.; LIANG, J.; et al. Direct preparation of hollow nanospheres with kraft lignin: A facile strategy for effective utilization of biomass waste. **BioResources**, v. 11, n. 2, p. 3073–3083, 2016.

LI, T.; TAKKELLAPATI, S. The current and emerging sources of technical lignins and their applications. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 12, n. 5, p. 756–787, 2018.

LIEVONEN, M.; VALLE-DELGADO, J. J.; MATTINEN, M. L.; et al. A simple process for lignin nanoparticle preparation. **Green Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 1416–1422, 2016.

LU, Q.; ZHU, M.; ZU, Y.; et al. Comparative antioxidant activity of nanoscale lignin prepared by a supercritical antisolvent (SAS) process with non-nanoscale lignin. **Food Chemistry**, v. 135, n. 1, p. 63–67, 2012.

LUCARINI, M.; PEDULLI, G. F. Free radical intermediates in the inhibition of the autoxidation reaction. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 6, p. 2106–2119, 2010.

LUO, H.; ABU-OMAR, M. M. Chemicals From Lignin. In: ABRAHAM M. (Ed.). **Encyclopedia of Sustainable Technologies**. New York: Elsevier, 2017. p 573–585.

MASSARO, M.; RIELA, S.; GUERNELLI, S.; et al. A synergic nanoantioxidant based on covalently modified halloysite-trolox nanotubes with intralumen loaded quercetin. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 13, p. 2229–2241, 2016.

MORRY, J.; NGAMCHERDTRAKUL, W.; YANTASEE, W. Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. **Redox Biology**, v. 11, p. 240-253, 2017.

NAGARAJAN, V.; MOHANTY, A. K.; MISRA, M. Sustainable green composites: Value addition to agricultural residues and perennial grasses. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 1, n. 3, p. 325–333, 2013.

NARON, D. R.; COLLARD, F. X.; TYHODA, L.; GÖRGENS, J. F. Characterisation of lignins from different sources by appropriate analytical methods: Introducing thermogravimetric analysis-thermal desorption-gas chromatography–mass spectroscopy. **Industrial Crops and Products**, 2017.

NIEMINEN, K.; PAANANEN, M.; SIXTA, H. Kinetic model for carbohydrate degradation and dissolution during kraft pulping. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 28, p. 11292-11302, 2014.

PONOMARENKO, J.; DIZHBITE, T.; LAUBERTS, M.; et al. Characterization of softwood and hardwood lignoblast kraft lignins with emphasis on their antioxidant activity. **BioResources**, v. 9, n. 2, p. 2051-2068, 2014.

PONOMARENKO, J.; LAUBERTS, M.; DIZHBITE, T.; et al. Antioxidant activity of various lignins and lignin-related phenylpropanoid units with high and low molecular weight. **Holzforschung**, v. 69, n. 6, p. 795-805, 2015.

POPESCU, C.-M.; VASILE, C.; POPESCU, M. C.; et al. Analytical methods for lignin characterisation. II) Spectroscopical studies. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 40, n. 8, p. 597-622, 2006.

POPRAC, P.; JOMOVA, K.; SIMUNKOVA, M.; et al. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 7, p. 592-607, 2017.

PU, Y.; CAO, S.; RAGAUSKAS, A. J. Application of quantitative ³¹P NMR in biomass lignin and biofuel precursors characterization. **Energy and Environmental Science**, v. 4, n. 9, p. 3154-3166, 2011.

QIAN, Y.; DENG, Y.; QIU, X.; LI, H.; YANG, D. Formation of uniform colloidal spheres from lignin, a renewable resource recovered from pulping spent liquor. **Green Chemistry**, v. 16, n. 4, p. 2156-2163, 2014.

QIAN, Y.; QIU, X.; ZHONG, X.; et al. Lignin Reverse Micelles for UV-Absorbing and High Mechanical Performance Thermoplastics. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 48, p. 12025-12030, 2015.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231-1237, 1999.

RENCORET, J.; GUTIERREZ, A.; NIETO, L.; et al. Lignin Composition and Structure in Young versus Adult Eucalyptus globulus Plants. **Plant Physiology**, v. 155, n. 2, p. 667-682, 2011.

RENCORET, J.; MARQUES, G.; GUTIÉRREZ, A.; et al. HSQC-NMR analysis of lignin in woody (Eucalyptus globulus and Picea abies) and non-woody (Agave sisalana) ball-milled plant materials at the gel state. **Holzforschung**, v. 63, n. 6, p. 691-698, 2009.

RIEGEL, I. C.; SAMIOS, D.; PETZOLD, C. L.; EISENBERG, A. Self-assembly of amphiphilic di and triblock copolymers of styrene and quaternized 5-(N,N-diethylamino) isoprene in selective solvents. **Polymer**, v. 44, n. 7, p. 2117-2128, 2003.

RINALDI, R.; JASTRZEBSKI, R.; CLOUGH, M. T.; et al. Paving the Way for Lignin Valorisation: Recent Advances in Bioengineering, Biorefining and Catalysis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 55, n. 29, p. 8164-8215, 2016.

DEL RÍO, J. C.; RENCORET, J.; PRINSEN, P.; et al. Structural

characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5922-5935, 2012.

ROSALES-CALDERON, O.; ARANTES, V. A review on commercial-scale high-value products that can be produced alongside cellulosic ethanol. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, 240, 2019.

VAN ROSSUM, S. A. P.; TENA-SOLSONA, M.; VAN ESCH, J. H.; EELKEMA, R.; BOEKHOVEN, J. Dissipative out-of-equilibrium assembly of man-made supramolecular materials. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 18, p. 5519–5535, 2017.

SALATIN, S.; BARAR, J.; BARZEGAR-JALALI, M.; et al. Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water soluble drug into Eudragit RL nanoparticles. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2017.

SAMENI, J.; KRIGSTIN, S.; SAIN, M. Solubility of Lignin and Acetylated Lignin in Organic Solvents. **BioResources**, v. 12, n. 1, p. 1548–1565, 2017a.

SAMENI, J.; KRIGSTIN, S.; SAIN, M. Characterization of Lignins Isolated from Industrial Residues and their Beneficial Uses. **BioResources**, v. 11, n. 4, 2017b.

SAMMONS, R. J.; HARPER, D. P.; LABBÉ, N.; et al. Characterization of organosolv lignins using thermal and FT-IR spectroscopic analysis. **BioResources**, v. 8, n. 2, p. 2752–2767, 2013.

SCHORR, D.; DIOUF, P. N.; STEVANOVIC, T. Evaluation of industrial lignins for biocomposites production. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 65–73, 2014.

SCHUBERT, S.; DELANEY, J. T.; SCHUBERT, U. S. Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: From history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). **Soft Matter**, v. 7, n. 5, p. 1581–1588, 2011.

SETTE, M.; WECHSELBERGER, R.; CRESTINI, C. Elucidation of lignin structure by quantitative 2D NMR. **Chemistry - A European Journal**, v. 17, n. 34, p. 9529–9535, 2011.

SHAKERI, F.; SHAKERI, S.; HOJJATOLESLAMI, M. Preparation and Characterization of Carvacrol Loaded Polyhydroxybutyrate Nanoparticles by Nanoprecipitation and Dialysis Methods. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 4, p. 697-705, 2014.

SHEN, H.; HONG, S.; PRUD, R. K.; LIU, Y. Self-assembling process of flash nanoprecipitation in a multi-inlet vortex mixer to produce drug-loaded polymeric nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 13, p. 4109-4120, 2011.

SHIKINAKA, K.; NAKAMURA, M.; NAVARRO, R. R.; OTSUKA, Y. Plant-Based Antioxidant Nanoparticles without Biological Toxicity. **ChemistryOpen**, v. 7, n. 9, p. 709–712, 2018.

SHROTRI, A.; KOBAYASHI, H.; FUKUOKA, A. Catalytic Conversion of Structural Carbohydrates and Lignin to Chemicals. In: SONG, C.S. (Ed.). **Advances in Catalysis**. New York: Elsevier, 2017. v. 60, p. 59-123.

SIPPONEN, M. H.; LANGE, H.; AGO, M.; CRESTINI, C. Understanding Lignin Aggregation Processes. A Case Study: Budesonide Entrapment and Stimuli

Controlled Release from Lignin Nanoparticles. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 6, n. 7, 2018.

SIPPONEN, M. H.; LANGE, H.; CRESTINI, C.; HENN, A. Lignin for Nano- and Microscaled Carrier Systems: Applications, Trends, and Challenges. *ChemSusChem*, v. 12, n. 10, p. 2039–2054, 2019.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; et al. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples - Technical Report: NREL/TP-510-42621, **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, 2008.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R. O.; et al. Determination of Ash in Biomass - Technical Report: NREL/TP-510-42622, **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, 2004a.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R. O.; et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass - Technical Report: NREL/TP-510-42618, **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, 2004b.

TEJADO, A.; PEÑA, C.; LABIDI, J.; ECHEVERRIA, J. M.; MONDRAGON, I. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1655–1663, 2007.

THULLURI, C.; PINNAMANENI, S. R.; SHETTY, P. R.; ADDEPALLY, U. Synthesis of Lignin-Based Nanomaterials/Nanocomposites: Recent Trends and Future Perspectives. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 153–160, 2016.

TIAN, D.; HU, J.; BAO, J.; et al. Lignin valorization: Lignin nanoparticles as high-value bio-additive for multifunctional nanocomposites. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2017.

TOMANI, P. The Lignoboost process. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 44, n. 1–3, p. 53–58, 2010.

TOMANI, P.; AXEGÅRD, P.; BERGLIN, N.; LOVELL, A.; NORDGREN, D. Integration of lignin removal into a kraft pulp mill and use of lignin as a biofuel. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 45, n. 7–8, p. 533–540, 2011.

VALGIMIGLI, L.; BASCHIERI, A.; AMORATI, R. Antioxidant activity of nanomaterials. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 14, p. 2036–2051, 2018.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 895–905, 2010.

VAZ, S. **Analytical techniques and methods for biomass**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2016.

VÁZQUEZ, G.; ANTORRENA, G.; GONZÁLEZ, J.; FREIRE, S. The influence of pulping conditions on the structure of acetosolv eucalyptus lignins. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 17, n. 1–2, p. 147–162, 1997.

VERT, M.; DOI, Y.; HELLWICH, K. H.; et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 377–410, 2012.

VINARDELL, M. P.; UGARTONDO, V.; MITJANS, M. Potential applications of antioxidant lignins from different sources. **Industrial Crops and Products**, v. 27, n. 2, p. 220–223, 2008.

WANG, C.; WANG, Z.; ZHANG, X. I. Amphiphilic Building Blocks for Self-

Assembly: From Amphiphiles to Supra-amphiphiles. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, n. 4, p. 608-618, 2012.

WITTKOWSKI, R.; RUTHER, J.; DRINDA, H.; RAFIEI-TAGHANAKI, F. Formation of Smoke Flavor Compounds by Thermal Lignin Degradation. In: TERANISHI, R.; TAKEOKA, G. R.; GÜNTERT, M. (Ed.). **Flavor Precursors: Thermal and Enzymatic Conversions**. Washington: American Chemical Society, 1992. p. 232–243.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, P.; BAQUERO, L. P.; LARROTA, H. R. Flavonoids: Potential Therapeutic Agents by Their Antioxidant Capacity. In: SEGURA-CAMPOS, M. R. (Ed.). **Bioactive Compounds**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2019. p. 265-288.

XIONG, F.; HAN, Y.; WANG, S.; et al. Preparation and formation mechanism of size-controlled lignin nanospheres by self-assembly. **Industrial Crops and Products**, v. 100, p. 146–152, 2017.

YANG, W.; FORTUNATI, E.; BERTOGLIO, F.; et al. Polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels with enhanced antioxidant and antibacterial properties induced by lignin nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, p. 275–284, 2018.

YANG, W.; OWCZAREK, J. S.; FORTUNATI, E.; et al. Antioxidant and antibacterial lignin nanoparticles in polyvinyl alcohol/chitosan films for active packaging. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 800–811, 2016.

YEARLA, S. R.; PADMASREE, K. Preparation and characterisation of lignin nanoparticles: evaluation of their potential as antioxidants and UV protectants. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 11, n. 4, p. 289–302, 2016.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. **Chemical Reviews**, 2011.

YOSHIDA, H.; MÖRCK, R.; KRINGSTAD, K. P.; HATAKEYAMA, H. Kraft lignin in polyurethanes. II. Effects of the molecular weight of kraft lignin on the properties of polyurethanes from a kraft lignin–polyether triol–polymeric MDI system. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 40, n. 11–12, p. 1819–1832, 1990.

ZHAO, W.; SIMMONS, B.; SINGH, S.; RAGAUSKAS, A.; CHENG, G. From lignin association to nano-/micro-particle preparation: Extracting higher value of lignin. **Green Chemistry**, v. 18, n. 21, p. 5693–5700, 2016.

ZHU, W.; WESTMAN, G.; THELIANDER, H. The molecular properties and carbohydrate content of lignins precipitated from black liquor. **Holzforschung**, v. 69, n. 2, p. 143–152, 2015.